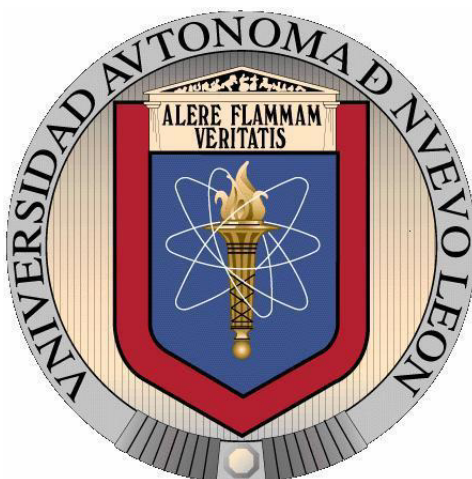


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA**



**TESIS**

**PERFIL DE CITOCINAS EN MUCOSA NASAL DE PACIENTES PEDIÁTRICOS CON  
INFECCIONES RESPIRATORIAS VIRALES AGUDAS**

**POR**


**LBT. STEPHEN ADONÁI LEÓN ICAZA**

**COMO REQUISITO FINAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS CON  
ORIENTACIÓN EN INMUNOLOGÍA MÉDICA**

**AGOSTO, 2017**

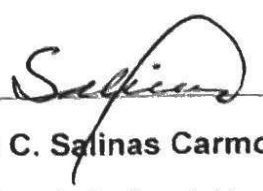
**"Perfil de citocinas en mucosa nasal de pacientes pediátricos con  
infecciones respiratorias virales agudas"**

Aprobación de la Tesis:



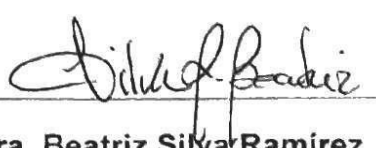
---

**Dr. Adrián G. Rosas Taraco**  
Director de Tesis



---

**Dr. Mario C. Salinas Carmona**  
Miembro de la Comisión



---

**Dra. Beatriz Silva Ramírez**  
Miembro de la Comisión



---

**Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez**  
Subdirector de Estudios de Posgrado

## DEDICATORIA

A las personas que más amo en mi vida, mi familia y mi novia. Gracias por creer siempre en mí...

## **Agradecimientos**

A mi padre y hermanos por siempre estar conmigo, motivarme y ayudarme a pesar de la distancia...

A mi novia Montse Rangel, gracias por las nuevas aventuras que emprendimos y por siempre ser mi motivación para seguir adelante sin importar nada...

Al Dr. Adrián Rosas Taraco por permitirme formar parte de su equipo de trabajo y darme la oportunidad de ir al extranjero a desarrollarme como profesionalista...

A la Dra. Betty y el Dr. Salinas por sus consejos y ayuda durante estos dos años...

A mi familia regia (Montse, Florencia, Frecia, Aide, Ana Itzel, Juan, Alex, Iris, Enrique), gracias por estos años de amistad y aprendizaje. Sin ustedes, no hubiera podido llegar al final de este camino llamado maestría...

Al Dr. José Juan Pérez por toda su ayuda y conocimiento brindado...

Al Dr. Daniel Cervantes García, la Lic. Rosario Lomelí y la maestra Adriana Cuellar por su amistad y apoyo. Así como por siempre motivarme a ser un mejor estudiante y profesionalista...

To my Friends in El Paso, Omar, Fernando and Tugba. Thanks for all your support...

A CONACYT por su financiamiento al proyecto bajo la convocatoria SALUD 2013-01-281871 y por la beca nacional y mixta brindada...

¡Gracias totales!

# CONTENIDO

Índice de Tablas.....	VIII
Índice de Figuras.....	IX
Abreviaturas.....	X
RESUMEN .....	XIII
Capítulo I: Introducción .....	1
1.1 Infecciones respiratorias agudas (IRAs) .....	1
1.1.1 Epidemiología de las IRAs.....	1
1.1.2 Agentes etiológicos de las IRAs .....	2
1.1.3 Cuadro clínico de las IRAs .....	2
1.2 Respuesta inmune innata antiviral .....	3
1.2.1 Receptores tipo Toll y el reconocimiento viral .....	4
1.2.2 Helicasas de RNA y reconocimiento viral .....	5
1.2.3 Rol de los IRFs en la respuesta inmune antiviral.....	6
1.3 Relación entre PRRs, vías de señalización y producción de citocinas en células infectadas con virus respiratorios .....	7
1.3.1 Producción de citocinas asociadas a la infección por virus respiratorios.	8
1.4 Antecedente directo .....	12
Capítulo II: Justificación .....	13
Capítulo III: Objetivos .....	14
3.1 Objetivo general.....	14
3.2 Objetivos específicos .....	14
Capítulo IV: Estrategia general .....	15

Capítulo V: Materiales y Métodos .....	16
5.1 Materiales y Reactivos .....	16
5.1.1 Material Biológico .....	16
5.1.2 Material y Equipo de Laboratorio .....	16
5.1.3 Reactivos .....	17
5.2 Metodología .....	18
5.2.1 Reclutamiento de pacientes y controles .....	18
5.2.2 Obtención de muestras.....	19
5.2.3 Clasificación de los pacientes según su cuadro clínico .....	20
5.2.4 Extracción de ácidos nucleicos.....	20
5.2.5 Detección y cuantificación de la carga viral de virus respiratorios .....	20
5.2.6 Detección de <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	22
5.2.7 Cuantificación de citocinas .....	23
5.2.8 Análisis estadísticos .....	24
Capítulo VI: Resultados .....	25
6.1 Población de estudio, características sociodemográficos y clínicas. ....	25
6.2 Virus como agentes etiológicos de IRAs en pacientes pediátricos. ....	26
6.3 <i>Streptococcus pneumoniae</i> en pacientes pediátricos con IRAs. ....	27
6.4 Citocinas en mucosa nasal de pacientes pediátricos con IRAs virales y <i>S. pneumoniae</i> . ....	28
6.4.1 TGF- $\beta$ no fue detectado en la mayoría de los pacientes con IRAs.....	28
6.4.2 Los agentes causales de las IRAs inducen diferentes perfiles de citocinas en mucosa nasal de pacientes pediátricos. ....	28
6.5 Los pacientes presentaron en su mayoría un estado grave de IRA.....	31
6.6 Asociación de los agentes etiológicos y citocinas en mucosa nasal con la gravedad de los pacientes .....	31

6.6.1 El género femenino presentó mayores cargas virales. ....	31
6.6.2 hMPV correlacionó con la gravedad e ingesta de leche materna. ....	32
6.6.3 <i>S. pneumoniae</i> correlacionó con la gravedad de la enfermedad. ....	33
6.6.4 Asociación de los niveles de citocinas con las variables de los pacientes. .....	34
Capítulo VII: Discusión .....	38
Capítulo VIII: Conclusiones .....	47
Capítulo IX: Bibliografía .....	48
Capítulo X: Anexos .....	59
10.1 Anexo1: Encuesta diseñada por el Departamento de Pediatría .....	59
10.2 Anexo2: Extracción de ácidos nucleicos .....	60
10.3 Anexo3: Detección de virus respiratorios por Luminex .....	61
10.4 Anexo4: Cuantificación de citocinas por Luminex .....	62

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Perfil de citocinas según el agente causal de la IRA. ....	9
<b>Tabla 2.</b> Datos sociodemográficos y características clínicas de la población de estudio. ....	25
<b>Tabla 3.</b> Mono y co-infecciones virales detectadas en pacientes con IRAs.....	26
<b>Tabla 4.</b> Mono y co-infecciones bacterianas detectadas por qPCR en pacientes con IRAs. ....	27
<b>Tabla 5.</b> <i>S. pneumoniae</i> incrementa el riesgo de cursar de manera grave con una IRA en pacientes pediátricos.....	28
<b>Tabla 6.</b> Comparación de la concentración de citocinas según los síntomas.....	35
<b>Tabla 7.</b> Correlación entre citocinas por virus con la edad de los pacientes. ....	36
<b>Tabla 8.</b> Correlación entre citocinas y carga viral. ....	37



## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Respuesta inmune innata antiviral. ....	7
<b>Figura 2.</b> Correlación entre citocinas y síntomas generados tras una IRA viral en pacientes adultos. ....	12
<b>Figura 3.</b> Cargas virales encontradas en pacientes pediátricos con IRAs virales. ....	27
<b>Figura 4.</b> Los niveles de citocinas dependen del agente causal de la IRA.....	29
<b>Figura 5.</b> El perfil de citocinas difiere dependiendo del agente causal de la IRA. ....	30
<b>Figura 6.</b> El 54% de los pacientes cursaban con una IRA grave.....	31
<b>Figura 7.</b> Pacientes femeninas presentan mayores cargas virales. ....	31
<b>Figura 8.</b> hMPV correlaciona con la gravedad e ingesta de leche materna del paciente. ....	32
<b>Figura 9.</b> <i>S. pneumoniae</i> correlaciona con la gravedad de los pacientes y se asocia con hMPV. ....	33
<b>Figura 10.</b> Citocinas proinflamatorias y Th2 se relacionan con la gravedad de la IRA.....	34
<b>Figura 11.</b> Perfil de citocinas según el diagnóstico clínico del paciente. ....	36
<b>Figura 12.</b> Perfil de citocinas dependiendo el virus respiratorio causal de la IRA. ....	42

## Abreviaturas

BECs	Células de epitelio bronquial
°C	Grados Centígrados
cDNA	DNA complementario
cm	Centímetros
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ds	Doble cadena
EGF	Factor de crecimiento epidermal
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
F	Primer Forward
g	Gravedades
HKU1	Coronavirus HKU1
hr	Hora
hMPV	Metaneumovirus Humano
hRV	Rinovirus Humano
IFN	Interferón
IL	Interleucina
IRA	Infección Respiratoria Aguda
IRAs	Infecciones Respiratorias Agudas
IRFs	Factores reguladores de interferones
ITRI	Infecciones del tracto respiratorio inferior
ITRS	Infecciones del tracto respiratorio superior
IVA	Virus de Influenza A
IVB	Virus de Influenza B
Log	Logaritmo
M	Molar
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
min	Minutos

μl	Microlitro
ml	Mililitro
MM	Master mix
μM	Micromolar
mM	Milimolar
N	Normal
NF	Factor nuclear
NK	Células asesinas naturales
NKT	Linfocitos NKT invariantes
nm	Nanómetros
No.	Número
P	Sonda de hidrólisis
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pg	Picogramos
PIV2	Virus de Parainfluenza 2
PRR	Receptores de reconocimiento de patrón
px	Pacientes
qPCR	PCR en tiempo real
qRT-PCR	PCR en tiempo real cuantitativa
R	Primer Reverse
RNA	Ácido ribonucleico
RPM	Revoluciones por minuto
RSV	Virus Sincitial Respiratorio
RT-PCR	Retrotranscripción
s	Segundos
SAPE	Estreptavidina ficoeritrina
sCD40L	Ligando soluble de CD40
SOCS1	Supresor de la señalización de citocinas 1
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
ss	Cadena sencilla
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta

TLR	Receptor tipo Toll
TNF $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
$\bar{x}$	Media

## RESUMEN

Stephen Adonai León Icaza

Obtención del grado: Septiembre 2017

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina

**Título:** Perfil de citocinas en mucosa nasal de pacientes pediátricos con infecciones respiratorias virales agudas.

**Número de páginas:** 63.

**Propósito del Estudio:** Las infecciones respiratorias agudas son causadas principalmente por virus respiratorios tales como hRV, RSV, hMPV, coronavirus, IV, PIV, bocavirus, adenovirus, entre otros, así como, bacterias como *S. pneumoniae*. Estas infecciones causan gran morbi-mortalidad a nivel mundial en niños menores a 5 años de edad. El perfil de citocinas generado a nivel local en el tracto respiratorio superior de estos sujetos pediátricos tras una infección respiratoria aguda así como la correlación de los agentes causales de la infección con la gravedad de los pacientes aún no está bien definida. En este estudio se incluyeron ciento veintiún pacientes pediátricos diagnosticados con infección respiratoria aguda reclutados en el departamento de pediatría de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Se obtuvieron dos tipos de muestras, un exudado faríngeo para la detección de los agentes causales de la infección respiratoria aguda mediante el kit Luminex xTAG RVP y qRT-PCR, y un lavado nasal para la determinación del perfil de citocinas de dichos pacientes mediante ELISA tipo sándwich (TGF- $\beta$ ) y el kit Bio-Plex Pro-Human (Premixed) Th17 Cytokine (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-21, IL-23, TNF $\alpha$ , IL-10, IFN $\gamma$ , IL-4, IL-31, IL-33, IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-25, sCD40L). **Contribuciones y conclusiones:** El 47% de los pacientes fue positivo para al menos un virus respiratorio, mientras que el 9.5% fueron positivos para *S. pneumoniae*. El 15.6% de los pacientes presentó alguna co-infección. Tanto la carga viral como la bacteriana de hMPV y *S. pneumoniae* respectivamente correlacionaron con la gravedad de la enfermedad de los pacientes ( $P < 0.05$ ). Los pacientes infectados con *S. pneumoniae* tienen un riesgo relativo  $> 3$  de cursar con la enfermedad grave ( $P = 0.05$ ). La carga viral en los pacientes del sexo femenino fue mayor que en los del sexo masculino ( $P < 0.05$ ). Los agentes etiológicos indujeron la producción de diversas citocinas y estas variaron según dichos agentes y las características clínicas de los pacientes. Estos hallazgos nos permiten sugerir que la carga bacteriana o viral correlaciona con el estado grave de los pacientes, asimismo la concentración de ciertas citocinas pueden ser biomarcadores de gravedad o posibles blancos terapéuticos.



---

Dr. Adrian G. Rosas Taraco

Director de Tesis

# **Capítulo I: Introducción**

## **1.1 Infecciones respiratorias agudas (IRAs)**

Las IRAs son un conjunto de enfermedades que afectan el aparato respiratorio y tienden a ser de evolución rápida, es decir, se resuelven generalmente en un periodo máximo de 15 días, no obstante, pueden llegar a agravarse hasta causar enfermedades como bronquiolitis o neumonía [1]. Las principales formas de transmisión de las IRAs son directamente por el contacto persona-persona, mediante aerosoles o microgotas generadas al momento de estornudar el paciente y por fómites, los cuales han estado en contacto directo con el patógeno responsable de la infección [2]. Estas IRAs se clasifican como infecciones del tracto respiratorio superior (ITRS) e infecciones del tracto respiratorio inferior (ITRI). El tracto respiratorio superior consiste en las vías respiratorias desde las fosas nasales hasta las cuerdas vocales en la laringe, incluyendo los senos paranasales y el oído medio, mientras que el tracto respiratorio inferior se conforma por la continuación de las vías respiratorias desde la tráquea y bronquio hasta el bronquiolo y el alveolo [3].

### **1.1.1 Epidemiología de las IRAs**

Las IRAs son la principal causa de mortalidad en niños menores de 5 años a nivel mundial [4], atribuyéndoseles 944 mil defunciones en el 2015; en México en el 2014, provocaron 3177 defunciones [5]. La incidencia global de las IRAs en los países en desarrollo se encuentra entre el 30 y 60% en la población pediátrica [6] y se estima que cada niño durante sus dos primeros años de vida sufre de 8 a 9 episodios de ITRS cada año; cerca del 10% de éstos son graves y requieren hospitalización, lo que implica una demanda elevada de atención médica. La mayoría de las muertes se deben a afecciones como bronquiolitis y neumonía, siendo estas en muchos casos de origen viral [7].

### **1.1.2 Agentes etiológicos de las IRAs**

Los principales agentes etiológicos de las IRAs incluyen bacterias, virus y hongos. Las bacterias comúnmente asociadas a las IRAs son *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*), *Haemophilus influenzae* y *Staphylococcus aureus*. Otras bacterias atípicas como *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydophila pneumoniae* y *Klebsiella pneumoniae* son detectadas con menor frecuencia [8].

*S. pneumoniae* es la principal bacteria responsable de las IRAs en niños debido a que está presente de forma asintomática en el 60% de ellos, esperando la llegada de otro serotipo de la misma bacteria para promover la colonización e infección del tracto respiratorio [9-11]. *S. pneumoniae* es el agente patógeno causal más común de la neumonía durante la niñez, causando un estimado de 1.8 millones de muertes a nivel mundial en niños menores a 5 años [12].

En cuanto a los virus, tenemos que el rinovirus humano (hRV), virus sincitial respiratorio (RSV), virus de la influenza A (IVA) y B (IVB), virus de la parainfluenza humana del 1 al 3 (PIV1-PIV3), adenovirus, coronavirus, metaneumovirus humano (hMPV) y bocavirus humano son más frecuentemente detectados en niños con IRAs. Se estima que en niños el 60% de los IRAs son causados por virus respiratorios [8]. Debido a esto nuestra investigación se enfoca en analizar y describir los virus respiratorios presentes en la población de estudio.

### **1.1.3 Cuadro clínico de las IRAs**

A pesar de que numerosos patógenos están asociados con las IRAs, sus manifestaciones clínicas son muy similares en todos los casos, independientemente de la causa. No obstante, podemos clasificar las manifestaciones clínicas dependiendo de si la infección se encuentra a nivel de tracto respiratorio superior o inferior.

#### **1.1.3.1 Cuadro clínico en tracto respiratorio superior**

Las ITRS son las enfermedades infecciosas más comunes, causando afecciones como rinitis (resfriado común), sinusitis, infecciones del oído medio, faringitis aguda o amigdalitis, epiglotitis y laringitis. De las anteriores, las infecciones del oído medio y la faringitis son las que causan las mayores complicaciones (sordera

y fiebre reumática aguda, respectivamente). La gran mayoría de las ITRS tienen una etiología viral [3].

Los virus causan entre el 70-90% de los episodios de ITRS, siendo los más reportados el RSV, hRV, PIV, IVA, adenovirus, hMPV, bocavirus y coronavirus. Se ha observado que los niños son los más afectados por estas infecciones e incluso los predisponen a infecciones bacterianas. La aspiración de secreciones y células infectadas pueden dar lugar a ITRI [13].

#### **1.1.3.2 Cuadro clínico en tracto respiratorio inferior**

Las ITRI ocupan un menor porcentaje, pero una mayor tasa de mortalidad. Los grupos que presentan mayor riesgo son los niños pequeños y los adultos mayores. Los principales síndromes causados por las ITRI son neumonía y bronquiolitis, las cuales se caracterizan por acelerar la frecuencia de la respiración [13].

La bronquiolitis ocurre principalmente en niños preescolares, el RSV es el virus más relacionado a esta condición (50-75% de los casos). La neumonía tiene una mayor incidencia en niños menores a 3 años, a esta condición se han asociado los virus RSV (50% de los casos) y PIV (25%). Se ha observado que el virus IVA causa neumonía severa con una alta tasa de mortalidad [13].

### **1.2 Respuesta inmune innata antiviral**

La respuesta inmune innata es la primera barrera de defensa contra patógenos virales. Las células del sistema inmune innato (células epiteliales, células dendríticas plasmacitoides, células natural killer (NK), etc.) expresan receptores de reconocimiento de patrón (PRR), los cuales regulan la síntesis de citocinas pro-inflamatorias e interferones tipo 1 (IFN1). La inducción de estas citocinas es mediada por algunos factores de transcripción como el factor nuclear (NF)-kB y los factores reguladores de interferones (IRFs). Los PRR que participan en la detección de los virus son los receptores tipo Toll (TLR), las helicasas de RNA y los sensores de DNA citosólicos [14] (Figura 1).

Los componentes de la respuesta inmune innata pueden ser tanto físicos como químicos (epitelio y mucosa). Los procesos fagocíticos en la respuesta inmune



innata incluyen la participación de células fagocíticas (monocitos, macrófagos y neutrófilos), células dendríticas y células NK, así como la producción de moléculas solubles (citocinas, interferones, complemento, proteínas de fase aguda y péptidos antimicrobianos) [15, 16].

Las células epiteliales están involucradas en la producción de proteínas (lactoferrina), enzimas (lisosima), péptidos antimicrobianos (defensinas), citocinas (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) y quimiocinas (CXCL8 Y CXCL10), las cuales actúan en conjunto para eliminar o neutralizar un virus. Cuando el epitelio pierde su integridad por el efecto de una infección viral, se observan consecuencias como la exposición de terminaciones nerviosas sensoriales, un incremento de los receptores encontrados en la membrana basal, el mal funcionamiento de las sustancias que modulan la sensibilidad, y finalmente, la activación de la respuesta inflamatoria conlleva a la alteración de los mediadores inflamatorios [17].

Las células NK son linfocitos con gránulos intracelulares. En la respuesta inmune innata antiviral, los receptores KIR de las células NK reconocen el complejo mayor de histocompatibilidad de clase 1 (MHC I) de las células infectadas, promoviéndose la liberación de los gránulos (perforinas y granzimas) y causando la muerte celular. Las células NK son activadas por la estimulación de interferones tipo 1 y de otras citocinas como IL-12, IL-15 e IL-18 producidas por las células infectadas, por células dendríticas y/o macrófagos [18].

Por último, otra de las células importantes en la respuesta inmune innata antiviral, son las células dendríticas, las cuales están presentes en varios tejidos como la piel, el epitelio respiratorio y en la mucosa. Las células dendríticas plasmacitoides (pDCs) representan un linaje especializado en la producción de interferones tipo 1 (principales moléculas antivirales), además contribuyen generando IL-12 e induciendo la producción de IL-15, la cual activa a las células NK [19].

### **1.2.1 Receptores tipo Toll y el reconocimiento viral**

Los receptores tipo Toll son proteínas de la familia de los PRRs y cumplen una función crítica de discriminación entre lo propio y lo no propio. Los TLRs de mamífero interactúan con productos microbianos para transmitir una serie de

cascadas de señalización involucrando adaptadores y quinasas que finalmente llevan a la activación de la transcripción de genes de citocinas. Los TLRs usan su dominio receptor común citoplasmático Toll de interleucina 1 (TIR) para transmitir respuestas celulares a través del reclutamiento de adaptadores, incluyendo MyD88, TRIF, TRAM y Mal [20]. La asociación entre las IRA virales y los TLRs se describió por primera vez con la participación de TLR4 en la respuesta inflamatoria de citocinas al RSV [21], donde se observó que la respuesta se genera al unirse directamente la proteína de fusión F del virus a dicho receptor.

Algunos TLRs, incluyendo TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 se localizan en el endosoma, además a TLR3 algunas células también lo expresan en su superficie. TLR3 interactúa con RNA de doble cadena (dsRNA), por lo que puede detectar algunos reovirus y sustancias homologas del RNA como poly I : C [14]. Se ha demostrado que TLR7 estimula la producción de citocinas por medio de su interacción con genomas virales de RNA de cadena sencilla (ssRNA), como el IVA y el virus de la estomatitis vesicular [22]. TLR9 se encuentra en el endosoma de manera predominante y es activado por islas CpG no metiladas de DNA encontradas en virus como el del Herpes simplex [23].

### **1.2.2 Helicasas de RNA y reconocimiento viral**

Uno de los PRRs citoplasmáticos encargados de la detección del RNA viral es el gen del ácido retinóico inducible (RIG-1), el cual es un miembro de la familia de helicasas de RNA de cajas DExD/H. El RNA viral 5' trifosfato ha demostrado ser ligando de RIG-1 [24]. RIG-1 contiene proteínas de interacción con dominios de activación y reclutamiento de caspasas (CARDs) así como el dominio TIR; es capaz de mediar interacciones homotípicas que promueven eventos de señalización. A través de los dominios CARD, RIG1 transmite sus señales río abajo para activar IRF3 y NF- $\kappa$ B, lo cual induce la producción de IFN- $\beta$ . Los dominios CARD poseen proteínas adaptadoras como MAVS e IPS-1. MAVS contiene un dominio CARD que le ayuda a la transducción de señales río debajo de RIG-1 [25]. Las quinasas IKK $\epsilon$  y TBK1 son claves para la fosforilación de IRF3

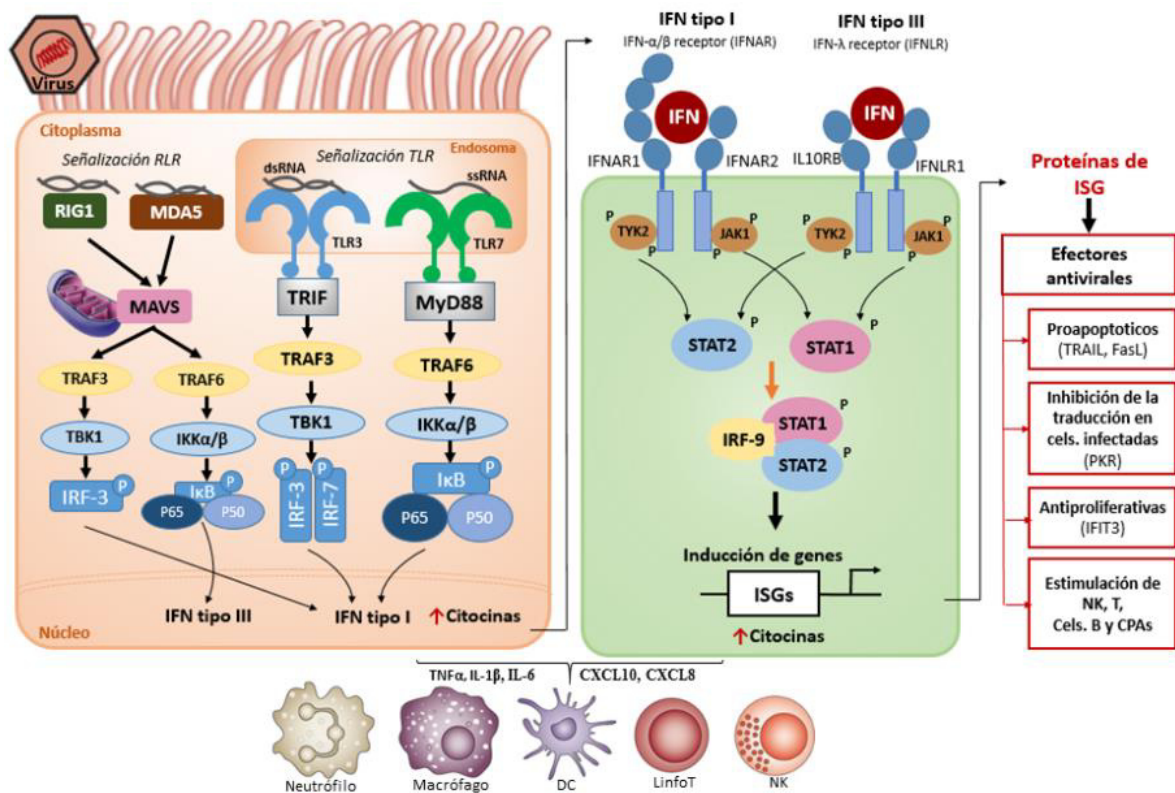
río debajo de MAVS y RIG-1. RIG-1 es responsable de la generación de interferones tipo 1 tras la detección de virus respiratorios [26].

El gen 5 asociado a la diferenciación del melanoma (MDA5) y Lgp2 son dos helicasas encontradas en el humano. Las funciones de MDA5 son muy similares a las de RIG-1, ya que guía la señalización de IRF y NF- $\kappa$ B a través de MAVS. En contraste, Lgp2 carece del dominio CARD y actúa como un regulador de retroalimentación negativa de la señalización de RIG-1 y MDA5 en respuesta a la estimulación viral [26, 27].

### **1.2.3 Rol de los IRFs en la respuesta inmune antiviral**

Los factores reguladores de interferón son transductores intracelulares esenciales para los genes de la respuesta inmune innata. IRF1, IRF3 e IRF7 han demostrado ser importantes en la respuesta de IFN $\alpha$ . El reconocimiento viral por los TLRs o las helicasas citosólicas guían hacia la fosforilación y dimerización de IRF3 o IRF7, seguido de su translocación al núcleo. La activación de IRF3 guía a la producción de IFN- $\beta$  mientras que IRF7 promueve la generación de IFN- $\alpha$ . IRF3 se expresa en la mayoría de las células de la respuesta inmune innata, mientras IRF7 se restringe a su expresión constitutiva en células dendríticas plasmacitoides. TLR3 y TLR4 reclutan al dominio TRIF para mediar la respuesta antiviral activando IRF3 e IRF7. Esta señalización ocurre río abajo del adaptador MAVS y es independiente de MyD88. Cabe recalcar que la señalización por MyD88 es requerida para la inducción de interferones vía TLR7, 8 y 9. La expresión restringida de IRF7 es muy importante debido a que solo las células que expresan IRF7 pueden producir IFN- $\alpha$  [28].

Por lo tanto, las células al estar expresando PRRs contribuyen al proceso inflamatorio con la consecuente generación de citocinas antivirales.



**Figura 1. Respuesta inmune innata antiviral.** Izquierda: vía de señalización PRRs. Derecha: vía de señalización de interferones.

### 1.3 Relación entre PRRs, vías de señalización y producción de citocinas en células infectadas con virus respiratorios

En general, la producción de citocinas en células inmunológicas como los linfocitos, es inducida a través de los receptores de estas mismas sobre las células. Este proceso ocurre en las células infectadas por virus. La producción de citocinas es guiada en la inmunidad innata a través de los PRRs, tales como TLRs, RLRs (RIG-1 y MDA5) y NLRPs (complejos del inflamasoma) [29]. En los TLRs, gracias a su señalización de moléculas río abajo de TRIF y MyD88 se guía la producción de varias citocinas como interferones tipo 1 y citocinas pro-inflamatorias. En las vías llamadas dependientes de MyD88 (TLR1, 2 y 5-9) se producen algunas citocinas pro-inflamatorias como  $\text{TNF}\alpha$ , IL-1, IL-6 e IL-8. En el caso de TLR3 su vía es independiente de MyD88, mientras que para TLR4 puede ser tanto dependiente como no. Lo anterior sugiere que la señalización de cada TLR es única y complicada [29].

En macrófagos y células epiteliales los NLRs juegan un papel crucial en el reconocimiento de virus y bacterias. Actualmente cerca de 20 tipos de NLRs han sido encontrados en el humano siendo los más representativos NLRP1, NLRP3 y NLRPC4. Los NLRs muestran propiedades tanto de PRR como de moléculas de señalización, además de que la región N-terminal de estos puede reclutar CARDs. Por ejemplo, NLRP3 se une a la procaspasa 1 a través de la activación de TLRs (TLR4) formando el inflamasoma; este complejo libera la caspasa 1 activa, la cual actúa sobre pro-IL-1 $\beta$  y pro-IL-18, guiando a su producción en las células [30].

RIG-1 y MDA5 son capaces de reconocer algunos virus de ssRNA como RSV e IV, lo cual lleva a la producción de interferones tipo 1 en fibroblastos. En particular, RIG-1 se une a IVB [31].

### **1.3.1 Producción de citocinas asociadas a la infección por virus respiratorios**

Se puede observar en la Tabla 1 el perfil de producción de citocinas en algunas células, muestras de pacientes y modelos animales infectados por virus respiratorios. Es referido en varios reportes que los virus respiratorios inducen diversos tipos de citocinas *in vivo* e *in vitro*. Previamente estudios *in vitro* demuestran que los virus IVA infectan células epiteliales del tracto respiratorio, con la consecuente elevación de IL-1, IL-6 e IL-8. Dicha producción se asocia al inflamasoma [29].

Las células epiteliales del tracto respiratorio infectadas con hRV producen IL-1, IL-6, IL-8, RANTES, eotaxina, IP10, IL-11, TNF $\alpha$ , GM-CSF, IFN-1 $\beta$  e IFN- $\lambda$ . Mientras que las células infectadas por RSV producen IL-1 e IL-4. Reportes adicionales con fibroblastos pulmonares humanos infectados con PIV3, mencionan una expresión excesiva de IL-1 $\beta$ , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, G-CSF, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-8, IP10, eotaxina y RANTES [29].

**Tabla 1.** Perfil de citocinas según el agente causal de la IRA.

<b>Virus</b>	<b>Muestra</b>	<b>Citocinas y Quimiocinas</b>	<b>Referencias</b>
<b>Rinovirus (hRV)</b>	BEAS-2B	IL-6, TNF $\alpha$ , IL -8, CXCL10	Koetzler et al., (2009) [32]; Sharma et al., (2009) [33].
	Aspirado nasal	IFN- $\gamma$ , IL -6, IL -8, CXCL10, eotaxin, RANTES	Lewis et al., (2012) [34].
	Espujo y suero	IL-6, IL-8	Yamaya, (2012) [35].
<b>Virus Sincitial Respiratorio (RSV)</b>	Aspirado traqueal	IL-6, IL-17	Kitazawa y Villena, (2014) [17].
	Lavado Nasofaríngeo	IL-2R, IL-6, IL-8, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MCP-1, IL-1 $\beta$ , IL1-RA, IL-7, EGF, HGF	Tabarani et al., (2013) [36].
	BECs	TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-12, e IL-18	See y Wark, (2008) [37]; Klouwenberg et al., (2009) [38].
	Fibroblastos	IFNs tipo I	Breiman et al., (2005) [39]; Loo et al., (2008) [40]; Jamaluddin et al., (2009) [41]; Bustos-Arriaga et al., (2011) [31].
	A549	GM-CSF	Ishioka et al., (2011) [42].
	MRC5	IL-1 $\beta$ , IL -6, TNF $\alpha$ , IL -1RA, IFN- $\gamma$ , IFN- $\lambda$ 1a, IL -2, IL -12, IL -4, IL -5, IL -10, IL -13, G-CSF , GM-CSF, eotaxin, RANTES, IL -8, CXCL10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , PDGF -bb, VEGF , FGF-basic	Seki et al., (2013) [43].
	HEP-2	IL-1 $\beta$ , MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , RANTES	Martínez et al., (2009) [44].
	BECs primarias	IFN- $\beta$ , IFN- $\lambda$ 1	Khaitov et al., (2009) [45].
<b>Metaneumovirus humano (hMPV)</b>	Aspirado nasofaríngeo	CXCL10, IL-18	Malmo et al., (2016) [46].
	Ratones BALB/c	GM-CSF, IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-12 p40	Guerrero-Plata et al., (2005) [47].
	A549, Ratones BALB/c, C57BL/6J	IFNs tipo III	Baños-Lara et al., (2015) [48].
	C57BL/6	IFNs tipo I	Hastings et al., (2015) [49].
<b>Coronavirus HKU1 (HKU1)</b>	Células de epitelio alveolar humano tipo II	IFN $\beta$ , CXCL10, RANTES, IL-6	Domínguez et al., (2013) [50].
	HEK293, HeLa	IFNs tipo I	Siu et al., (2014) [51].
<b>Bocavirus</b>	Aspirado Nasal	IFN- $\gamma$	Milder y Arnold., (2009) [52].
	Cultivo celular interfase aire-líquido (CuFi-8), Lavado	EGF, VEGF, CCL17, TNF $\alpha$ , TNF- $\beta$	Khalfaoui et al., (2016) [53].

<b>Virus de la influenza (IV)</b>	Bronqueoalveolar		
	Aspirado	IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4	Guido et al., (2016) [54];
	Nasofaríngeo		Chung et al., (2008) [55].
	Suero	TNF $\alpha$ , IL-2, IL-5, IL-8	Hirose et al, (2014) [56].
	Lavado Nasal	IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-2	Melendi et al., (2007) [57].
	THP1	IL -1 $\beta$ , IL-18	Iwasaki and Pillai, (2014) [58].
	Ratones BALB/c	TGF $\beta$ , IL-17A, IL-17F	Iwasaki and Pillai, (2014) [58].
	Espuito y suero	IL-6, IL-8, RANTES	Yamaya, (2012) [35].
<b>Parainfluenza 3 (PIV3)</b>	Fibroblastos	IFNs tipo I	Breiman et al., (2005) [39]; Loo et al., (2008) [40]; Jamaluddin et al., (2009) [41]; Bustos-Arriaga et al., (2011) [31].
	MRC5	IL -1 $\beta$ , IL -6, TNF $\alpha$ , IL -1ra, IFN- $\gamma$ , IL -2, IL -4, IL -5, IL -10, G-CSF, GM-CSF, eotaxina, RANTES, IL -8, CXCL10, PDGF , VEGF	Yoshizumi et al., (2010) [59].
<b>Bacteria</b>	<b>Muestra</b>	<b>Citocinas y Quimiocinas</b>	<b>Referencias</b>
<b><i>S. pneumoniae</i></b>	Suero	IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-6, IL-10, TNF $\alpha$	Bordon et al., (2013) [60]; Cheng et al., (2013) [61].
	Lavado Bronqueoalveolar	IL-1 $\beta$ , IL-8, GM-CSF, MIP-1 $\alpha$	Cheng et al., (2013) [61].
	C57BL/6 neonatos	IL-10	Bogaert et al., (2009) [62]

Los resultados anteriores permiten reconocer perfiles diferenciales de producción de citocinas de acuerdo al agente viral, sin embargo son necesarios más estudios para determinar patrones de inducción específicos para cada virus. Es importante resaltar que los resultados obtenidos, en su mayoría son derivados de líneas celulares y modelos animales (Tabla 1) en donde el fondo genético de la cepa tiene marcada influencia en la generación de la respuesta inmune como sucede en la cepa C57BL/6 que promueve una respuesta Th1, sin embargo la cepa BALB/C es Th2 [63]. En cuanto a los resultados derivados de pacientes, estos comprometen tracto respiratorio inferior lo cual conlleva a una respuesta sistémica que no permite reconocer que sucede en el tracto respiratorio superior en pacientes pediátricos con IRAs.

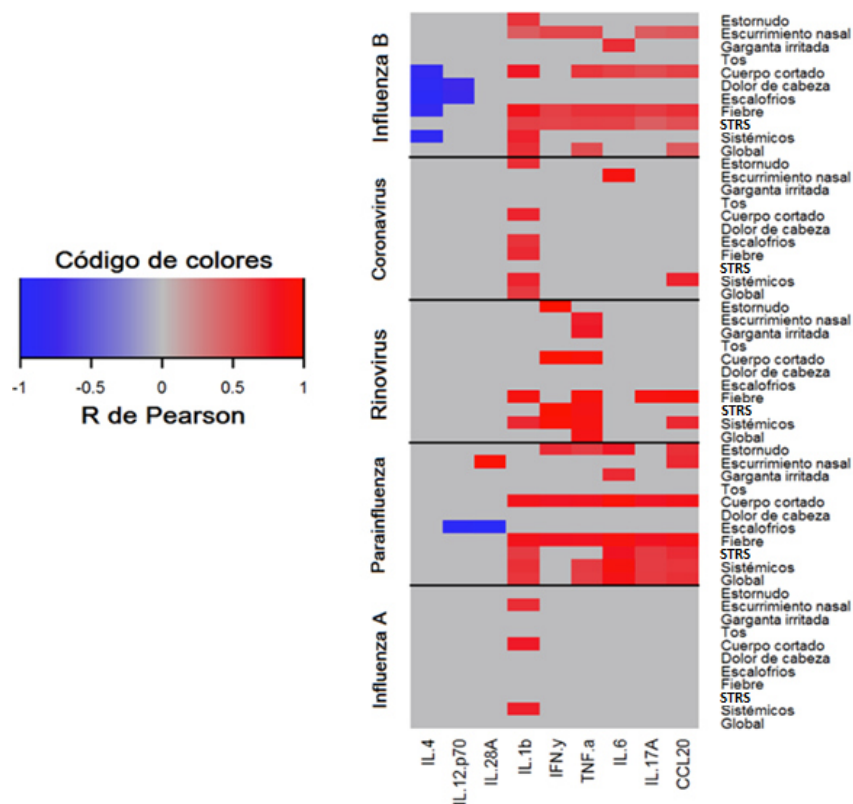
Estos antecedentes permiten a nuestro grupo de investigación enfocarse en la determinación de citocinas en el microambiente del tracto respiratorio superior en pacientes con IRAs para la detección de blancos terapéuticos y biomarcadores de gravedad.



## 1.4 Antecedente directo

En nuestro grupo de investigación un trabajo anterior (Tesis, Arredondo Loza 2016), en el cual se determinó el perfil de citocinas en pacientes adultos con IRA viral, se encontró una asociación entre la sintomatología clínica y el perfil de citocinas. En el caso de infección por IVB, IL-4 se encontró subregulada en la mayoría de los síntomas a nivel sistémico, por lo que en este caso, dicha citocina no podría estar controlando la síntesis de citocinas pro-inflamatorias, lo cual favorece al daño causado por el virus.

En las IRAs de tracto superior en adultos, la producción de citocinas pro-inflamatorias como IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-17A se encuentran elevadas y correlacionan con los síntomas (Figura 2).



**Figura 2. Correlación entre citocinas y síntomas generados tras una IRA viral en pacientes adultos.** La mayoría de los síntomas se asocian a altas concentraciones de citocinas pro-inflamatorias. Correlación calculada con r de Pearson. El color azul indica subproducción y el rojo sobreproducción de las citocinas indicadas.

## **Capítulo II: Justificación**

A nivel mundial y nacional las IRAs causadas por virus tienen índices de morbi-mortalidad elevadas, convirtiéndolas en la principal causa de defunción en niños menores de cinco años. En la actualidad existen pocos estudios que evalúen el perfil de citocinas en mucosa nasal de pacientes pediátricos con IRAs virales en tracto respiratorio superior, debido a esto es importante entender y esclarecer el microambiente presente de citocinas para determinar mecanismos regulatorios e identificar biomarcadores de gravedad así como posibles blancos terapéuticos para estas IRAs virales.

## Capítulo III: Objetivos

### 3.1 Objetivo general

Determinar el perfil de citocinas en mucosa nasal de pacientes pediátricos con infecciones respiratorias virales agudas.

### 3.2 Objetivos específicos

1. Identificar el (los) agente(s) causal(es) de la infección respiratoria viral aguda en los pacientes pediátricos.
2. Identificar la presencia de *Streptococcus pneumoniae* en pacientes pediátricos con infección respiratoria aguda.
3. Cuantificar los niveles de citocinas en fluido nasal de los pacientes.
4. Correlacionar nuestras variables con la gravedad del paciente.

## Capítulo IV: Estrategia general



## **Capítulo V: Materiales y Métodos**

### **5.1 Materiales y Reactivos**

#### **5.1.1 Material Biológico**

- Exudado Faríngeo (3 ml, pacientes y controles)
- Lavado Nasal (1 ml, pacientes y controles)

#### **5.1.2 Material y Equipo de Laboratorio**

##### **a) Labnet BioPette (Illinois, Estados Unidos)**

- Micropipetas autoclaveables de 0.5-10  $\mu$ l, 2-20  $\mu$ l, 20-200  $\mu$ l, 100-1000  $\mu$ l.
- Micropipeta multicanal de 20-200  $\mu$ l.

##### **b) Eppendorf (Hamburgo, Alemania)**

- Micropipeta de 0.1-2.5  $\mu$ l.
- Puntillas de 0.1 – 10  $\mu$ l.
- Tubos para microcentrífuga de 1.5 ml.
- Microcentrífuga.

##### **c) Corning (Nueva York, Estados Unidos)**

- Tubos para PCR de 0.2 ml.
- Crioviales de 2 ml.
- Tubos de polipropileno de 15 ml.
- Puntillas para micropipetas de 0.5-10  $\mu$ l, 2-20  $\mu$ l, 20-200  $\mu$ l, 100-1000  $\mu$ l.

##### **d) Bio-Rad (California, Estados Unidos)**

- Tirillas y tapas para qPCR.
- Minicentrífuga.
- Bio-Plex Pro Wash Station.
- Termociclador CFX-96.
- Bio-Plex 200.

**e) Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, Estados Unidos)**

- NanoDrop 2000.
- Lector de placas de ELISA.
- Campana de bioseguridad nivel II.

**f) Proveedor de laboratorio en general**

- Hisopos de rayón estériles.
- Pipetas berales de 2 ml.
- Abatelenguas.

**5.1.3 Reactivos**

**a) BD (Nueva Jersey, Estados Unidos)**

- Transporte Viral Universal de 3 ml.

**b) Qiagen (Hilden, Alemania)**

- QIAamp MinElute Virus Spin Kit (Extracción de ácidos nucleicos).
- QuantiNova Probe RT-PCR Kit (qRT-PCR con Sondas de Hidrólisis).
- QuantiNova SYBR Green PCR Kit (qRT-PCR con SYBR Green).

**c) Bio-Rad (California, Estados Unidos)**

- iQ Supermix (qPCR con Sondas de Hidrólisis).
- Bio-Plex Pro-Human (Premixed) Th17 Cytokine Panel (Panel de 15 citocinas).

**d) R&D Systems (Minnesota, Estados Unidos)**

- Human TGF-beta 1 DuoSet ELISA (ELISA tipo Sandwich para TGF- $\beta$ ).

**e) PrimerDesign (Southampton, Reino Unido)**

- Primerdesign™ genesig® Advanced Kits for RSV, hRV, hMPV, IVA, IVB, (qRT-PCR con Sondas de Hidrólisis).

**f) Luminex Corporation (Texas, Estados Unidos)**

- xTAG® Respiratory Viral Panel Fast v2 (Panel para detección de Virus Respiratorios).

**g) Alpha DNA (Quebec, Canada)**

- Primers HKU1 [64]:
  - a. F-HKU1: CCTAACTGTGATGTGAGTGATGTCA
  - b. R-HKU1: ACAAACCAAAGACCATACCATTTCATAACT
- Primers PIV2 [65]:
  - a. F-PIV2: GCATTTCCAATCTTCAGGACTATGA
  - b. R-PIV2: ACCTCCTGGTATAGCAGTGAAGTGAAC

**h) Applied Biosystems (California, Estados Unidos)**

- Primers *S. pneumoniae* [66]:
  - a. F-*S. pneumoniae*: ACGCAATCTAGCAGATGAAGC
  - b. R-*S. pneumoniae*: TGTTTGGTTGGTTATTCGTGC
  - c. P-*S. pneumoniae*:  
6FAMTTTGCCGAAAACGCTTGATACAGGGTAMRA

**i) PiSA (Nuevo León, México)**

- Solución salina.

## **5.2 Metodología**

### **5.2.1 Reclutamiento de pacientes y controles**

Se realizó un estudio prospectivo de casos y controles entre las temporadas de invierno 2014-2015, 2015-2016 y 2016-2017. En conjunto con el Departamento de Pediatría del Hospital Universitario de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), se reclutaron tanto pacientes como controles, pareados por edad y género, que cumplieran con los siguientes criterios:

- Criterios de inclusión:
  - a. Pacientes menores de 18 años de edad no importando género.

- b. Diagnóstico clínico de infección respiratoria aguda.
- Criterios de exclusión:
  - a. Paciente trasladado de otro hospital en el que hubiera estado internado por más de 48 horas.
  - b. Internamiento en los tres meses previos por más de 48 horas por cualquier causa.
  - c. Episodio de infección respiratoria aguda en los últimos 30 días.
  - d. Tuberculosis pulmonar activa o sospechada por características de la placa.
  - e. Paciente con cualquier neoplasia y/o que esté recibiendo quimioterapia.
  - f. Paciente con síndrome de inmunodeficiencia adquirida por VIH.
  - g. Uso de esteroides de manera crónica.
- Criterios de eliminación:
  - a. Baja cantidad de muestra.
  - b. Mala calidad de la muestra.

Al momento del reclutamiento, tanto a los tutores legales de los pacientes como de los controles se les aplicó una encuesta diseñada por el Departamento de pediatría (ver Anexo1) para recaudar datos clínicos y sociodemográficos.

Este estudio fue aprobado por el Comité de investigación y ética de la Facultad de Medicina de la UANL y contó con el siguiente número de registro: IN-13-007.

### **5.2.2 Obtención de muestras**

- Exudado faríngeo

Se sujetó la lengua del paciente con un abatelenguas y se frotó con firmeza la pared posterior de la garganta (orofaringe) con el hisopo de rayón estéril, teniendo cuidado de no tocar la epiglotis para no provocar el vómito. Posteriormente, el hisopo se introdujo en un tubo con 3 ml de transporte viral universal; las muestras se mantuvieron a 4°C hasta llegar al laboratorio. Ya en este, los 3 ml de transporte viral se repartieron en alícuotas de 500 µl en crioviales y se guardaron a -80°C hasta su uso.



- Lavado nasal

Se colocó la cabeza del paciente con una inclinación de 45°, se llenó una pipeta beral de 2 ml con solución salina y esta se introdujo de 2-3 cm en la nariz, se expulsó y aspiró la solución salina varias veces en la fosa nasal; dicha solución con el fluido nasal se recuperó en crioviales y se mantuvo a 4°C hasta llegar al laboratorio. Ya en este, se hicieron alícuotas de 250 µl en tubos para microcentrífuga de 1.5 ml y se guardaron a -80°C hasta su uso.

### **5.2.3 Clasificación de los pacientes según su cuadro clínico**

Con base en la encuesta elaborada por el Departamento de Pediatría, tomamos la sección del cuadro clínico para clasificar a nuestros pacientes en tres grandes grupos según la gravedad de sus síntomas: a) Los pacientes que presentaron rinorrea y/o tos se clasificaron como leves; b) Los pacientes que presentaron alguno de los síntomas previos más fiebre y/o vómito y/o hiporexia y/o astenia se clasificaron como moderados; c) Los pacientes que presentaron alguno de los síntomas anteriores más disnea o sólo disnea se clasificaron como graves.

### **5.2.4 Extracción de ácidos nucleicos**

Se extrajeron los ácidos nucleicos con el kit QIAamp MinElute Virus Spin bajo las condiciones del fabricante (ver Anexo2). Se partió de 250 µl de muestra de transporte viral de cada paciente o control, a dichas muestras se les realizó un proceso de lisado con proteasas y altas temperaturas, después se transfirieron a columnas con membranas de sílice para la unión de los ácidos nucleicos a esta, facilitando la eliminación de contaminantes mediante el uso de soluciones amortiguadoras y finalmente se eluyeron los ácidos nucleicos purificados en 50 µl de Buffer AVE. Se verificó la pureza de todos los ácidos nucleicos extraídos mediante el equipo NanoDrop 2000.

### **5.2.5 Detección y cuantificación de la carga viral de virus respiratorios**

#### **5.2.5.1 Detección de virus respiratorios por Luminex**

Se realizó la detección de virus respiratorios (IVA, IVA subtipo H1, H3 y H1N1, IVB, RSV, Coronavirus NL63, OC43, HKU1 y 229E, PIV1 a PIV4, hMPV, Enterovirus/hRV, AdV y Bocavirus) a partir de los ácidos nucleicos de exudado

faríngeo mediante el kit xTAG® Respiratory Viral Panel Fast v2 bajo las condiciones del fabricante (ver Anexo3). Se realizó la síntesis del cDNA a partir de 10 µl del RNA obtenido de las muestras. El cDNA fue usado como templado para la realización de una PCR, en la cual se usaron primers específicos, los cuales contenían secuencias etiquetadoras únicas. En aquellas muestras donde se encontraba las secuencias específicas para los primers, los amplicones generados fueron marcados con biotina. Posteriormente, se realizó la hibridación de estas secuencias a las perlas, las cuales se encontraban conjugadas con sondas específicas para cada virus a analizar. En aquellos casos donde hubo hibridación, esta podría ser detectada utilizando la molécula fluorescente SAPE (Estreptavidina-ficoeritrina), la cual se uniría a la biotina del amplicón hibridado. Las perlas fueron identificadas y analizadas en el equipo Bio-Plex 200, este identificó el color de cada perla (específica para cada virus o subtipo) y la presencia o ausencia del complejo biotina-SAPE, así es como cada virus generó una señal y las muestras fueron identificadas como positivas o negativas por los softwares Bio-Plex Manager y Data Pro del equipo.

#### **5.2.5.2 Confirmación y carga viral de virus respiratorios por qRT-PCR**

- qRT-PCR con sondas de hidrólisis (PrimerDesign)

Se realizó la confirmación de la detección y cuantificación de la carga viral del hRV, IVA, IVB, RSV y hMPV mediante sondas de hidrólisis de PrimerDesign. Primero se preparó el MM (Master Mix) para cada muestra (ácidos nucleicos extraídos previamente), estándar o control negativo agregando 5 µl de 2x Probe RT-PCR Master mix, 0.1 µl de QN Probe RT mix, 0.5 µl de 20x primer-probe mix y 1.9 µl de RNase free water, a continuación se colocaron 7.5 µl del MM más 2.5 µl de muestra, estándares o control negativo según correspondiera en las tirillas para PCR, dichas tirillas se colocaron en el termociclador y se corrió la qRT-PCR para todos los virus ya mencionados bajo las siguientes condiciones: 45°C por 10 min, 95°C por 5 min, 59 ciclos de 95°C por 10 s, 60°C por 1 min. La carga viral se calculó con la ayuda de la curva estándar generada.

- qRT-PCR con SYBR Green

Se realizó la confirmación de la detección de PIV2 y HKU1 mediante SYBR Green empleándose los siguientes primers específicos para PIV2 [65]: F-PIV2: GCATTTTC CAATCTTCAGGACTATGA; R-PIV2: ACCTCCTGGTATAGCAGTGACTGAAC; y para HKU1 [64]: F-HKU1: CCTAACTGTGATGTGAGTGATGTCA; R-HKU1: ACAAACCAAAGACCATACCATTTCATAACT. Se preparó el MM para cada muestra (ácidos nucleicos extraídos previamente) y control negativo agregando 5 µl de 2x Quantinova SYBRgreen RT-PCR MM, 0.1 µl de QN SYBRgreen RT-Mix, 0.25 µl de primer forward (1 µM para PIV2 y 10 µM para HKU1), 0.25 µl de primer reverse (1 µM para PIV2 y 10 µM para HKU1) y 1.9 µl de RNase free water, a continuación se colocaron 7.5 µl del MM más 2.5 µl de muestra o control negativo según correspondiera en las tirillas para PCR, dichas tirillas se colocaron en el termociclador y se corrió la qRT-PCR bajo las siguientes condiciones: 50°C por 10 min, 95°C por 2 min, 49 ciclos de 95°C por 5 s, 60°C por 10 s.

### 5.2.6 Detección de *Streptococcus pneumoniae*

A partir del DNA obtenido de los exudados faríngeos tanto de pacientes como de controles, se realizó la detección de *S. pneumoniae* por qPCR empleándose los siguientes primers y sonda específicos [66] F-*S.pneumoniae*: ACGCAATCTAG CAGATGAAGC; R-*S.pneumoniae*: TGTTTGGTTGGTTATTCGTGC; P-*S.pneumoniae*: 6FAM-TTTGCCGAAAACGCTTGATACAGGG-TAMRA. Se preparó el MM para cada muestra (DNA) y control negativo agregando 5 µl de iQ Supermix, 0.15 µl tanto de forward como de reverse (50 µM), 0.2 µl de sonda (10 µM) y 1.5 µl de RNase free water, a continuación se colocaron 7 µl del MM más 3 µl de muestra o control negativo según correspondiera en las tirillas para PCR, dichas tirillas se colocaron en el termociclador y se corrió la qPCR bajo las siguientes condiciones: 95°C por 10 min, 49 ciclos de 95°C por 15 s, 60°C por 1 min.

## **5.2.7 Cuantificación de citocinas**

### **5.2.7.1 ELISA tipo sándwich**

Se realizó una ELISA tipo sándwich para la cuantificación de TGF- $\beta$  a partir del fluido nasal tanto de pacientes confirmados con IRA viral o bacteriana así como de los sujetos controles. Primero, un día antes de realizar el ensayo se prepararon todos los reactivos de acuerdo a las instrucciones del fabricante y se unió el anticuerpo de captura a una placa de 96 Pocillos. El día del ensayo, en principio se realizó la activación del TGF- $\beta$  de las muestras (se partió de 80  $\mu$ l de lavado nasal) mediante hidrólisis ácida con HCl, ésta se neutralizó con NaOH 1.2 N / HEPES 0.5 M, posteriormente, las muestras, blancos y estándares se colocaron en sus respectivos pozos en la placa de ELISA. A continuación, se añadieron a cada uno de los pocillos 100  $\mu$ l del anticuerpo de detección y tras un periodo de incubación de dos horas, se colocaron 100  $\mu$ l de estreptavidina-peroxidasa a estos mismos. Finalmente, se agregaron 100  $\mu$ l de solución sustrato a cada pozo y tras 20 min de incubación con ésta, se detuvo la reacción con 50  $\mu$ l de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N y se leyó la placa a 450 nm. La concentración de la citocina se valoró mediante una curva estándar.

### **5.2.7.2 Luminex**

Se realizó un ensayo Luminex para 15 citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-21, IL-23, TNF $\alpha$ , IL-10, IFN $\gamma$ , IL-4, IL-31, IL-33, IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-25, sCD40L) mediante el kit Bio-Plex Pro-Human (Premixed) Th17 Cytokine (ver Anexo4) a partir de 100  $\mu$ l de fluido nasal tanto de pacientes confirmados con IRA viral o bacteriana así como de los sujetos controles. En primer lugar se agregaron 50  $\mu$ l de perlas 1x conjugadas a anticuerpos a la placa de 96 pozos, tras un lavado se añadió 50  $\mu$ l de los estándares, blancos y controles, así como 100  $\mu$ l de fluido nasal a cada pocillo según como correspondiera. Después de una incubación de 1 hr, la placa se lavó de nuevo y se colocaron 25  $\mu$ l de anticuerpo de detección 1x, transcurridos 30 min se lavó la placa y se colocó en cada pozo 50  $\mu$ l de SAPE 1x. Finalmente, para la lectura de la placa se lavó el plato y se resuspendieron las perlas en 125  $\mu$ l de buffer de ensayo, permitiéndonos el análisis de la placa en el Bio-Plex 200 por los softwares Bio-Plex Manager y Data Pro.

### **5.2.8 Análisis estadísticos**

Se correlacionaron y compararon tanto la carga viral, Cts así como la concentración de citocinas con todas las variables (género, estatus clínico del paciente, síntomas, tipo de infección, hospitalización, seno materno, exposición a humo de tabaco, prematuridad, edad, diagnóstico clínico, entre otras) asociadas a la gravedad de los pacientes.

Todos los análisis estadísticos así como la construcción de figuras fueron realizados con el software GraphPad Prism v6.0 (La Jolla, California). La carga viral fue expresada en un principio como el número de copias determinado por PCR en tiempo real y posteriormente se transformó al logaritmo de base 10 del número de copias de RNA/ $\mu$ l mientras que la concentración de citocinas se expresó en pg/ml. La prueba exacta de Fisher fue usada para determinar diferencias entre nuestros pacientes y controles. Para las variables paramétricas se realizaron comparaciones mediante la prueba T student o ANOVA con comparación múltiple de Tukey, en el caso de las variables no paramétricas, las comparaciones fueron hechas mediante la U de Mann-Whitney y la prueba de Kruskal-Wallis con comparación múltiple de Dunn. Las correlaciones fueron analizadas usando el coeficiente de Pearson o el de Spearman según correspondió. Adicionalmente, se realizaron cálculos del riesgo relativo (RR). Los valores de  $P < 0.05$  fueron considerados como significativos.

## Capítulo VI: Resultados

### 6.1 Población de estudio, características sociodemográficos y clínicas.

Se colectaron 121 muestras de exudado faríngeo y lavado nasal, de éstas, se eliminaron 6 debido a una mala calidad y baja cantidad de la muestra. Este trabajo de investigación incluyó 115 pacientes y 9 sujetos controles.

La media de la edad de los 115 pacientes fue de 5 años, siendo 76 de estos menores a 1 año de edad. Las principales causas de hospitalización en nuestros pacientes pediátricos fueron bronquiolitis y neumonía. Pacientes y controles se encontraban pareados por edad y género ( $P=1$ ) (Tabla 2).

**Tabla 2.** Datos sociodemográficos y características clínicas de la población de estudio.

	Pacientes (n=115)	Controles (n=9)	Valor de *P
<b>Género</b>			
Masculino	68 (59%)	5 (56%)	1
Femenino	47 (41%)	4 (44%)	
<b>Edad</b>			
<1 año (0.3-11 meses)	76 (66%)	6 (67%)	1
≥ 1 año (1-16 años)	39 (34%)	3 (33%)	
Hospitalización	41 (36%)	No aplica	-
Ambulatorio	74 (64%)		
<b>Seno Materno</b>			
Si	59 (51%)	9 (100%)	-
No	11 (10%)	-	
No reportado	45 (39%)	-	
Prematuro	12 (10%)	-	-
A término	69 (60%)	9 (100%)	
No reportado	34 (30%)	-	

\*P calculada con Exacta de Fisher.

## 6.2 Virus como agentes etiológicos de IRAs en pacientes pediátricos.

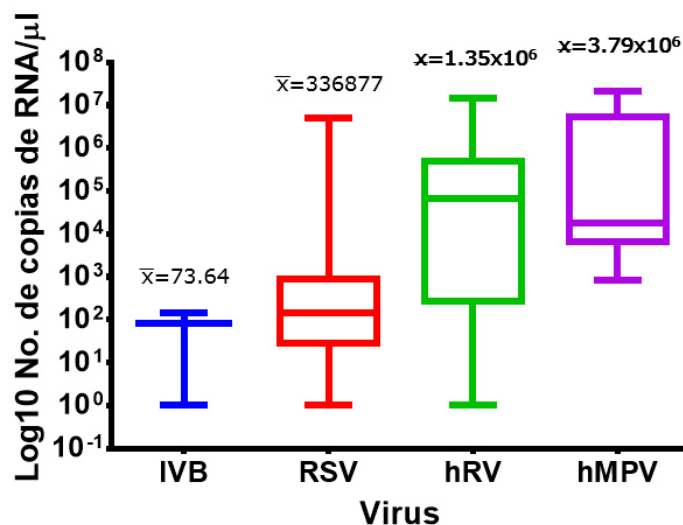
Se corrieron las 115 muestras con el kit xTAG® Respiratory Viral Panel Fast v2 en el equipo Bio-Plex 200. Sesenta y tres muestras resultaron positivas para al menos 1 virus, la mono-infección más frecuente fue Enterovirus-hRV (12 pacientes) mientras que la co-infección más detectada fue Enterovirus-hRV /IVB/PIV2 (5 pacientes).

Se realizó la validación de dichos resultados por qRT-PCR mediante sondas de hidrólisis con PrimerDesign y SYBR Green. El 47% (54 pacientes) de los pacientes resultaron positivos para al menos 1 virus, de los cuales el 81.5% (44 pacientes) fueron mono-infecciones, siendo la más frecuente con hRV en 15 pacientes mientras que la co-infección más común fue con HKU1 en 8 pacientes (Tabla 3). No se detectó ningún paciente infectado con IVA ni con PIV2. No se realizó validación ni cuantificación de carga viral para PIV3 y Bocavirus.

**Tabla 3.** Mono y co-infecciones virales detectadas en pacientes con IRAs.

Mono-infecciones		Co-infecciones	
Virus	No. de pacientes	Virus	No. de pacientes
hRV	15	hRV/PIV3	1
RSV	14	RSV/HKU1	2
hMPV	7	hMPV/HKU1	2
Bocavirus	6	hMPV/PIV3	1
HKU1	1	Bocavirus/HKU1	2
IVB	1	IVB/HKU1	2
<b>TOTAL</b>	<b>44</b>	<b>TOTAL</b>	<b>10</b>

El hMPV fue el virus con las mayores cargas virales en los pacientes pediátricos mientras que IVB fue el que tuvo la menor carga viral (Figura 3).



**Figura 3. Cargas virales encontradas en pacientes pediátricos con IRAs virales.** Diagrama de cajas y bigotes: n=45 pacientes. IVB n=3, RSV n=16, hRV n=16, hMPV n=10. Kruskal-Wallis  $P<0.01$ .

### 6.3 *Streptococcus pneumoniae* en pacientes pediátricos con IRAs.

Para descartar una co-infección bacteriana en nuestras muestras, se identificó por qPCR a *S. pneumoniae*, principal bacteria causante de IRAs. Resultando 11 muestras positivas, de las cuales 3 fueron mono-infecciones bacterianas y 8 co-infecciones bacteria/virus. De estos pacientes, cinco se encontraban hospitalizados, uno de ellos con mono-infección y 4 con co-infección. Las co-infecciones bacteria/virus más frecuentes fueron con hRV y hMPV, ambos con 3 pacientes (Tabla 4).

**Tabla 4.** Mono y co-infecciones bacterianas detectadas por qPCR en pacientes con IRAs.

Mono-infecciones		Co-infecciones	
Bacteria	No. de pacientes	Bacteria/Virus	No. de pacientes
<i>S. pneumoniae</i>	3	<i>S. pneumoniae</i> /hRV	2
		<i>S. pneumoniae</i> /hRV/PIV3	1
		<i>S. pneumoniae</i> /RSV	1
		<i>S. pneumoniae</i> /hMPV	1
		<i>S. pneumoniae</i> /hMPV /HKU1	2
		<i>S. pneumoniae</i> /Bocavirus	1
<b>TOTAL</b>	<b>3</b>	<b>TOTAL</b>	<b>8</b>



Después de la confirmación de infecciones virales (54 positivos) y/o bacterianas (3 positivos para mono-infección), únicamente nos quedamos con 57 pacientes en los que se detectó algún patógeno.

También se determinó mediante el cálculo del riesgo relativo que es 3.77 veces más probable cursar con una IRA grave cuando se detecta la infección o co-infección por *S. pneumoniae* (Tabla 5).

**Tabla 5.** *S. pneumoniae* incrementa el riesgo de cursar de manera grave con una IRA en pacientes pediátricos.

Característica	Infección bacteriana	Infección viral	P	Riesgo relativo
Grave	9	22	0.049	3.77
Leve	2	24		

#### 6.4 Citocinas en mucosa nasal de pacientes pediátricos con IRAs virales y *S. pneumoniae*.

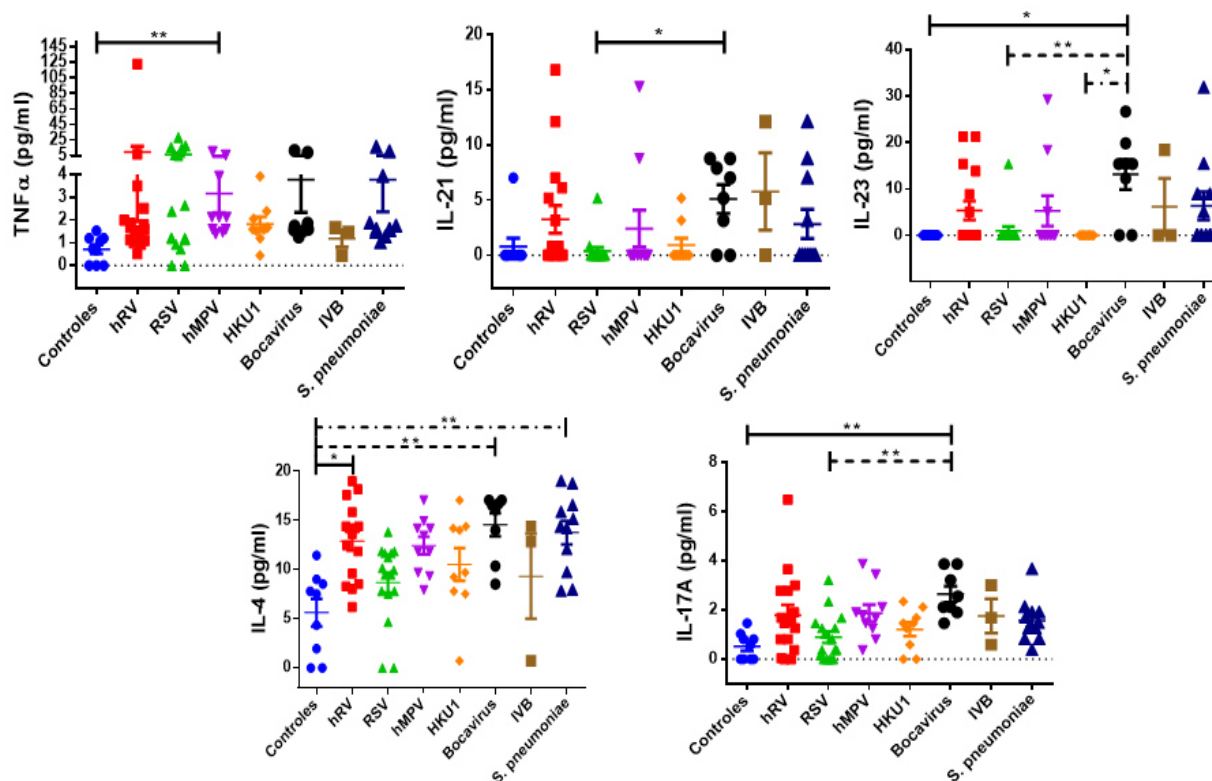
##### 6.4.1 TGF- $\beta$ no fue detectado en la mayoría de los pacientes con IRAs.

Se realizó la cuantificación de TGF- $\beta$  a partir del fluido nasal de los 57 pacientes con IRA viral y/o bacteriana mediante el kit Human TGF-beta 1 DuoSet ELISA bajo las condiciones del fabricante. Únicamente fue posible detectar los niveles de TGF- $\beta$  en 2 pacientes, los cuales estaban infectados por hRV y bocavirus, teniendo concentraciones de TGF- $\beta$  de 70.96 pg/ml y 68.55 pg/ml, respectivamente.

##### 6.4.2 Los agentes causales de las IRAs inducen diferentes perfiles de citocinas en mucosa nasal de pacientes pediátricos.

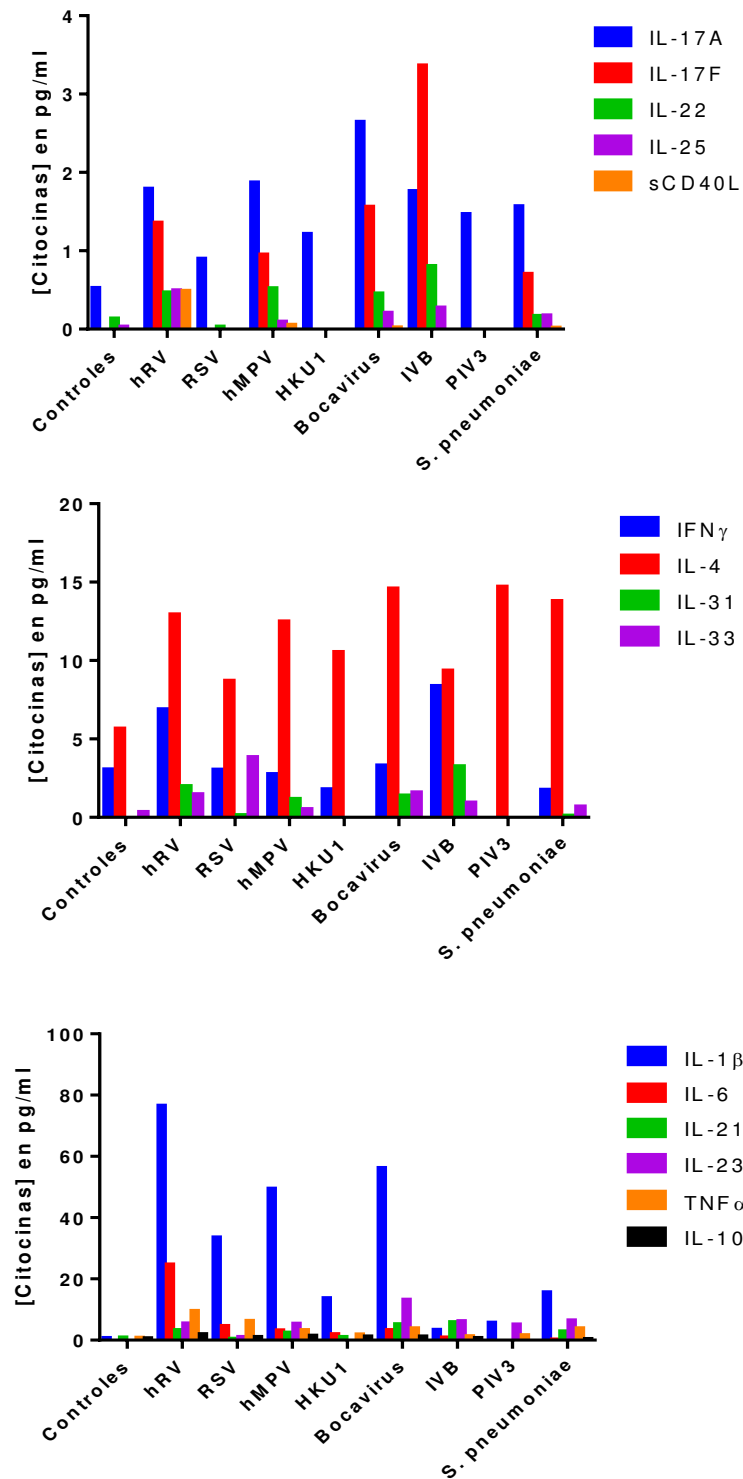
Se compararon los niveles de citocinas por agente infeccioso de los 57 pacientes mediante Luminex, obteniendo diferencias significativas en las siguientes: hMPV produce las mayores concentraciones de TNF- $\alpha$  ( $P<0.01$ ), mientras que Bocavirus produce las mayores concentraciones de IL-21 ( $P<0.05$ ), IL-23 ( $P<0.05$ ), IL-4 ( $P<0.01$ ) e IL-17A ( $P<0.01$ ). También se observó que tras la infección por hRV y *S.*

*pneumoniae* se producen altas concentraciones de IL-4 ( $P<0.05$  y  $P<0.01$ ) (Figura 4).



**Figura 4. Los niveles de citocinas dependen del agente causal de la IRA,  $n=57$  px y 9 controles. Se muestra la Media  $\pm$  SEM, Kruskal-Wallis ( $P<0.05$ ), Comparación múltiple de Dunns \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ .**

No se obtuvo diferencia significativa con las otras 10 citocinas medidas (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IFN $\gamma$ , IL-31, IL-33, IL-17F, IL-22, IL-25, sCD40L). Se muestra a continuación un resumen de las concentraciones de todas las citocinas detectadas dependiendo del agente infeccioso (Figura 5).



**Figura 5. El perfil de citocinas difiere dependiendo del agente causal de la IRA. Las gráficas muestran la media de la concentración de citocinas.**

### 6.5 Los pacientes presentaron en su mayoría un estado grave de IRA.

Se clasificaron los 57 pacientes en 3 grandes grupos: leve, moderado y grave, según su cuadro clínico como se mostró en la metodología. La mayoría de nuestros pacientes presentaron un estatus clínico grave (Figura 6).

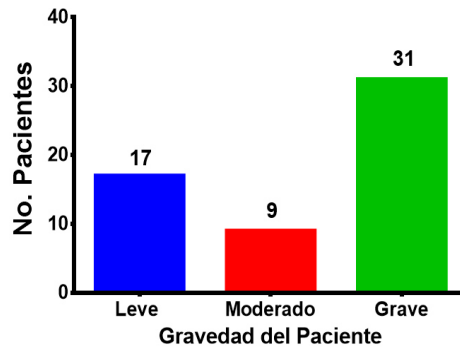


Figura 6. El 54% de los pacientes cursaban con una IRA grave, n=57 px.

### 6.6 Asociación de los agentes etiológicos y citocinas en mucosa nasal con la gravedad de los pacientes

#### 6.6.1 El género femenino presentó mayores cargas virales.

Se realizó la comparación entre las cargas virales de los pacientes y su gravedad, síntomas, tipo de infección, hospitalización, seno materno, exposición a humo de cigarro, prematuridad, resolución de la sintomatología, diagnóstico clínico y género, únicamente siendo significativa esta última ( $P<0.05$ ) (Figura 7). Se observó que las pacientes femeninas presentan mayores cargas virales. Además, se realizó la correlación de la carga viral con la edad y la gravedad de los pacientes, resultando no significativas.

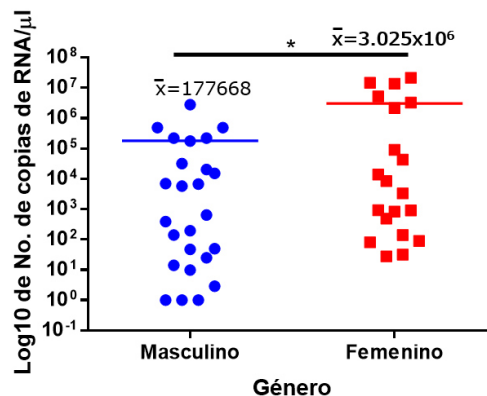
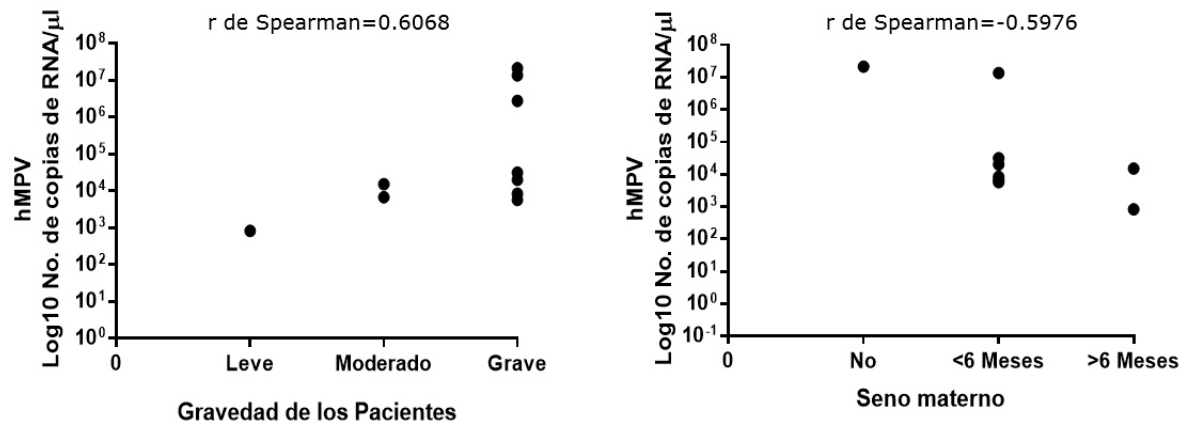


Figura 7. Pacientes femeninas presentan mayores cargas virales, masculino n=25, femenino n=20. Media de la carga viral. T-Student  $P<0.05$ .

### 6.6.2 hMPV correlacionó con la gravedad e ingesta de leche materna.

Se realizó la comparación entre las cargas virales de los pacientes infectados con hMPV y sus síntomas, tipo de infección, hospitalización, exposición a humo de cigarro, prematuridad, resolución de la sintomatología, diagnóstico clínico y género, resultando no significativas. Se encontró una correlación positiva fuerte entre la carga viral de hMPV y la gravedad, así como una correlación negativa fuerte con la ingesta de seno materno de los pacientes, resultando significativas (Figura 8). Es decir, a mayor carga viral de hMPV más grave estará el paciente y mientras mayor sea el tiempo que se le da seno materno, menor será su carga viral.



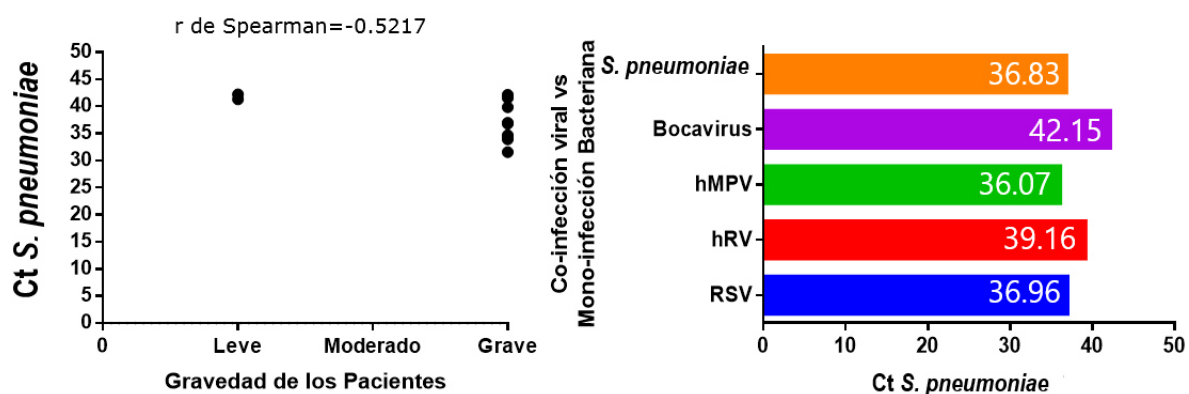
**Figura 8. hMPV correlaciona con la gravedad e ingesta de leche materna del paciente**, gravedad de los pacientes  $n=10$ , seno materno  $n=9$ .  $r$  de Spearman= gravedad  $P<0.05$ , seno materno  $P<0.01$ .

También se realizó la comparación entre los Cts de HKU1 así como de las cargas virales de los pacientes infectados con hRV o RSV y sus síntomas, tipo de infección, hospitalización, seno materno, exposición a humo de cigarro, prematuridad, resolución de la sintomatología, diagnóstico clínico y género, resultando no significativas. Además, se realizó la correlación de HKU1, hRV o RSV con la edad y la gravedad de los pacientes, resultando no significativas.

### 6.6.3 *S. pneumoniae* correlacionó con la gravedad de la enfermedad.

Se realizó la comparación entre los Cts de los pacientes infectados con *S. pneumoniae* y sus síntomas, tipo de infección, hospitalización, exposición a humo de cigarro, prematuridad, resolución de la sintomatología, diagnóstico clínico y género, resultando no significativas. Se encontró una correlación negativa fuerte significativa entre los Cts de *S. pneumoniae* con la gravedad de los pacientes (Figura 9). Es decir, a mayor Ct (menor carga bacteriana) menos grave estará el paciente.

Además se realizó la comparación entre los Cts de *S. pneumoniae* dependiendo de si se detectaba en co-infección con algún virus respiratorio o a manera de mono-infección, resultando no significativa; no obstante se puede apreciar como al presentarse en co-infección con hMPV se observa un menor Ct, incluso que en la mono-infección bacteriana (Figura 9).

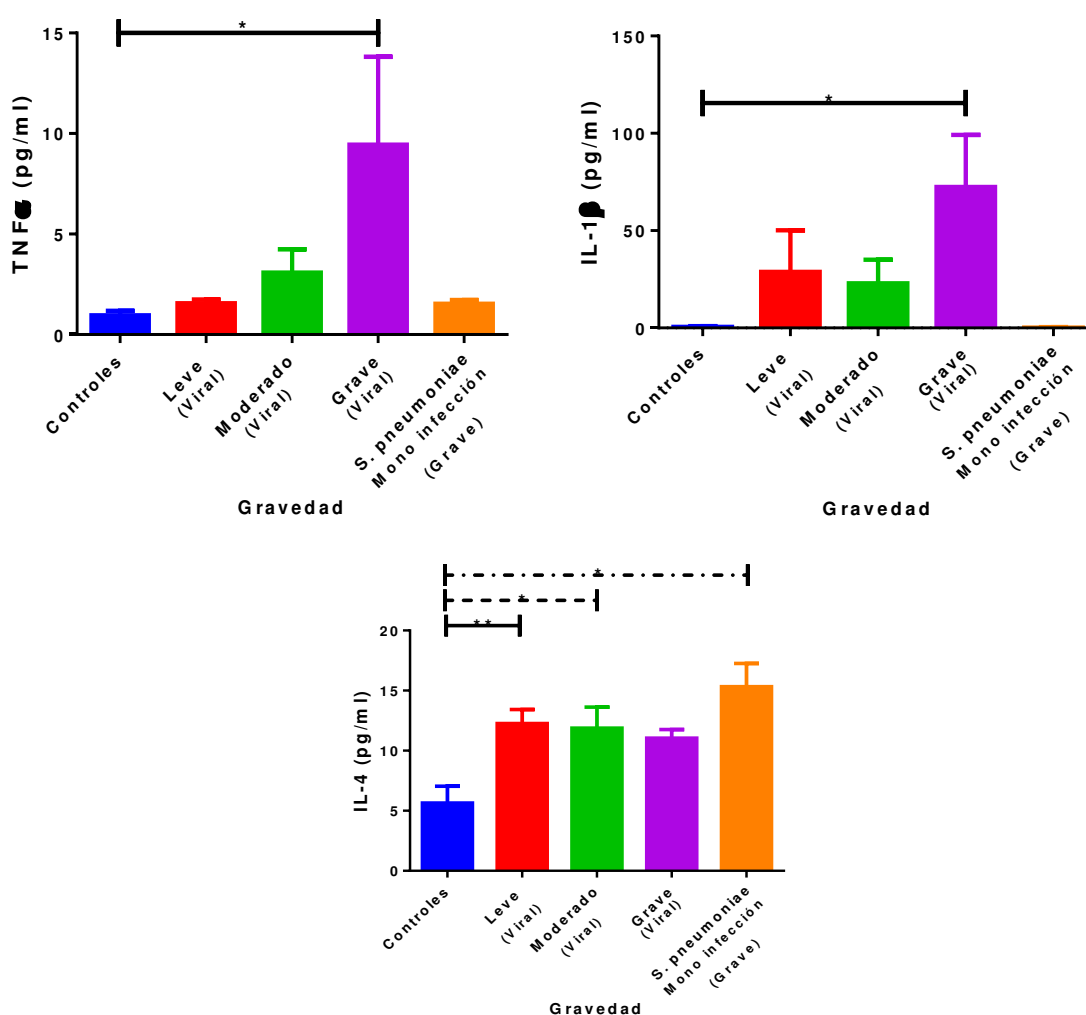


**Figura 9. *S. pneumoniae* correlaciona con la gravedad de los pacientes y se asocia con hMPV.** Gravedad de los pacientes n=11, co-infección viral vs mono-infección bacteriana n=11. r de Spearman=  $P < 0.0001$ .

## 6.6.4 Asociación de los niveles de citocinas con las variables de los pacientes.

### 6.6.4.1 Citocinas proinflamatorias y Th2 se relacionan con el estado de la enfermedad en pacientes pediátricos con IRA virales y/o bacteriana.

Se compararon los niveles de las 15 citocinas por gravedad de los pacientes, obteniendo diferencias significativas en las siguientes: TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  se producen en mayores concentraciones tras una IRA viral grave ( $P<0.05$ ), mientras que IL-4 se produce en grandes cantidades tras una infección leve ( $P<0.01$ ) o moderada viral ( $P<0.05$ ), así como en una infección grave bacteriana ( $P<0.05$ ) (Figura 10).



**Figura 10. Citocinas proinflamatorias y Th2 se relacionan con la gravedad de la IRA,** n=57 px y 9 controles. Se muestra Media  $\pm$  SEM. Kruskal-Wallis (TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$   $P<0.01$ , IL-4  $P<0.05$ ). Comparación múltiple de Dunns \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ .

#### 6.6.4.2 Los niveles de citocinas se asociaron principalmente a fiebre en los pacientes pediátricos con IRAs.

Se realizó la comparación de la concentración de citocinas por síntomas de los pacientes, obteniendo en su mayoría altas concentraciones de citocinas que fungen como pro-inflamatorias en el caso cursar la infección con fiebre, de hecho varias de estas son conocidas como pirógenos endógenos (Tabla 6).

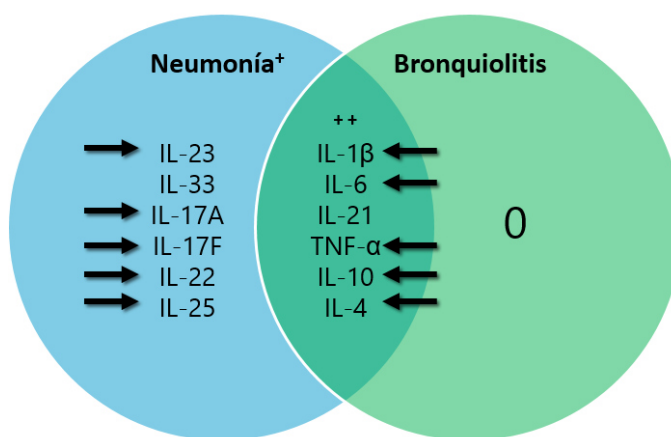
**Tabla 6.** Comparación de la concentración de citocinas según los síntomas.

	Citocina	Síntoma	Prueba	p
Pro y antiinflamatorias	TNF- $\alpha$	Fiebre	Kruskal-Wallis	<0.05
		Rinorrea	Kruskal-Wallis	<0.05
		Tos	Kruskal-Wallis	<0.05
	IL-6	Fiebre	Kruskal-Wallis	<0.01
		Tos	Kruskal-Wallis	<0.05
		Astenia	Kruskal-Wallis	<0.05
Th1 y Th2	IL-23	Fiebre	U Mann-Whitney	<0.001
	IL-21	Fiebre	U Mann-Whitney	<0.01
	IL-4	Fiebre	Kruskal-Wallis	<0.05
		Tos	Kruskal-Wallis	<0.05
Th17 y Linfo B	IL-33	Fiebre	U Mann-Whitney	<0.05
	IL-17A	Fiebre	Kruskal-Wallis	<0.05
	IL-22	Fiebre	Kruskal-Wallis	<0.05
	IL-25	Fiebre	U Mann-Whitney	<0.05
	IL-17F	Fiebre	U Mann-Whitney	<0.01



#### 6.6.4.3 Perfil de citocinas según el diagnóstico clínico de los pacientes.

Al comparar la presentación clínica (neumonía o bronquiolitis) con las concentraciones de citocinas, encontramos a IL-23, IL-33, IL-17A, IL-17F, IL-22 e IL-25 exclusivamente en los pacientes con neumonía resaltando que IL-33 no ha sido reportada anteriormente. Los pacientes con bronquiolitis no tienen un perfil exclusivo pero comparte la expresión de IL-21 con los pacientes complicados con neumonía (Figura 11).



**Figura 11. Perfil de citocinas según el diagnóstico clínico del paciente, n=15** bronquiolitis, 16 neumonía y 9 controles. \*U de Mann-Whitney.  $P < 0.05$  vs controles. \*\*Kruskal-Wallis.  $P < 0.05$  vs controles.

#### 6.6.4.4 Citocinas correlacionaron con la edad de los pacientes infectados con hRV y bocavirus.

Se correlacionaron la concentración de citocinas por virus con la edad de los pacientes, obteniéndose correlaciones significativas de moderadas a fuertes en el caso de IFN $\gamma$ , IL-4 e IL-23 (Tabla 7).

**Tabla 7.** Correlación entre citocinas por virus con la edad de los pacientes.

Correlación entre citocinas y edad (POR VIRUS)				
Virus	Citocina	r de Spearman	P	Correlación
hRV	IFN $\gamma$	-0.497	0.009	Moderada
	IL-4	0.43	0.048	Moderada
Bocavirus	IL-23	0.734	0.021	Fuerte

#### 6.6.4.5 Citocinas correlacionaron negativamente con carga viral de hRV y coronavirus HKU1.

Se correlacionó la concentración de citocinas con la carga viral por virus, observándose en todas las correlaciones significativas como a mayor concentración de citocinas menor es la carga viral (Tabla 8).

**Tabla 8.** Correlación entre citocinas y carga viral.

Correlación entre citocinas y carga viral				
Virus	Citocina	r de Spearman	<i>P</i>	Correlación
hRV	IL-23	-0.367	0.023	Moderada
	IL-4	-0.4404	0.023	Moderada
	IL-22	-0.1786	0.036	Leve
Correlación entre citocinas y Ct				
Coronavirus HKU1	IL-6	-0.495	0.047	Moderada

## Capítulo VII: Discusión

Se colectaron 115 muestras de exudado faríngeo de pacientes pediátricos con diagnóstico presuntivo de IRA viral. A dichas muestras se les realizó Luminex y PCR en tiempo real para la detección y confirmación de la infección viral, obteniendo 54 (46.9%) pacientes positivos para al menos un virus. El bajo rendimiento en la detección de agentes virales puede deberse a un mal diagnóstico clínico, una toma incorrecta de la muestra o la elección inadecuada del método para obtener la muestra. Analizando estos tres factores, en nuestro estudio, podemos descartar de inmediato la elección inadecuada del método de toma de muestra, ya que empleamos el exudado faríngeo colocado en transporte viral, dicho método ha sido considerado un gran avance en la detección de virus respiratorios por PCR [67], además de ser el método donde se obtiene una mayor cantidad de células epiteliales [68].

La mono-infección viral más frecuente fue hRV con 15 pacientes (27.7%) (Tabla 3). El hRV es el virus causante del resfriado común [69] y es frecuentemente aislado de tracto respiratorio superior en pacientes pediátricos menores a 5 años con IRA [70, 71]. La co-infección más común fue con el coronavirus HKU1, presentándose en 8 pacientes (14.8%) (Tabla 3); los coronavirus ya han sido previamente reportados como una de las principales co-infecciones en pacientes pediátricos, presentándose en promedio en un 50% de las ocasiones a manera de co-infección con algunos de los virus que tienden a presentar cargas virales altas como RSV y hMPV [72-74]. IVA y Adenovirus no fueron detectados en ninguno de nuestros pacientes; este hallazgo no es raro, algunos estudios reportan que en pacientes mayores de 15 años la infección por IVA tiene mayor prevalencia que en aquellos pacientes menores de 15 años [75], lo cual coincide con los resultados de esta investigación. En el caso de Adenovirus, este se presenta principalmente en los meses de junio a agosto (clima cálido-templado) [76]; las muestras de esta investigación fueron tomadas en el invierno.

Interesantemente, se detectaron 10 pacientes (18.5%) con hMPV (Tabla 3); existen pocos estudios que han reportado este virus infectando el tracto respiratorio superior en pacientes pediátricos [77-79], siendo este uno de ellos. Además, el hMPV fue el virus con las mayores cargas virales ( $\bar{x}$ = 3.79x10<sup>6</sup> copias de RNA/μl) en pacientes pediátricos (Figura 3), lo cual concuerda con el hecho de que hMPV es un virus de altas cargas virales [72].

De los 115 pacientes, 8 presentaron co-infección *S. pneumoniae*-virus y 3 fueron mono-infecciones bacterianas (Tabla 4). Los virus más detectados en los pacientes con co-infección bacteria/virus fueron hRV, RSV y hMPV; los cuales han sido previamente reportados en co-infecciones con *S. pneumoniae* [80-82]. Cinco de los 11 pacientes con *S. pneumoniae* se encontraban hospitalizados. Se encontró un riesgo relativo de 3.77 veces más de cursar con la enfermedad grave cuando se encuentra esta bacteria comparado con aquellos pacientes que sólo presenta mono o co-infecciones virales (Tabla 5) lo cual coincide con algunos reportes previos [82-84]; aunque ciertos artículos mencionan que este riesgo se ve sumamente mitigado gracias a los antibióticos de amplio espectro usados en el tratamiento de las IRAs [85].

Actualmente, se reconoce que las co-infecciones por un agente etiológico diferente (virus-bacteria) a la infección primaria es predisponente a un estadio clínico grave. En el caso de *S. pneumoniae*, la cual se puede encontrar como flora normal en niños asintomáticos (60% de incidencia, incluso tras la inmunización con la vacuna antineumocócica conjugada) [9-11], es decir, forma parte del microambiente propio del tracto respiratorio superior de algunas personas; al momento de presentarse una infección viral, ésta vuelve al epitelio respiratorio más susceptible a una colonización bacteriana [86]. Dicha susceptibilidad se da por diversos mecanismos virales como la disminución de la función mucociliar, daño y pérdida de la integridad de las capas epiteliales, la subexpresión de péptidos antimicrobianos como β-defensinas y la capacidad de algunos virus de escindir residuos de ácido ciálico, dándole acceso a las bacterias a receptores

enmascarados por dichos residuos y finalmente la sobreexpresión de receptores (PAFr, ICAM-1, P5F) requeridos para la adherencia de las bacterias [80].

Basado en todos los datos anteriores, se pudo determinar que en nuestra población de estudio la prevalencia de las mono-infecciones bacterianas fue de 5.2% mientras que de las virales fue de 68.42%, así como las co-infecciones virus-virus y bacteria-virus se presentaron en el 26.31% de los casos, estos datos varían un poco con respecto a estudios previos como el de Jaehyeon [87] donde se reporta una prevalencia de 11.52% de las mono-infecciones bacterianas, 71.42% de las mono-infecciones virales y 26.31% de las co-infecciones virus-virus y bacteria-virus. Estas variaciones entre los dos estudios pueden estar determinadas por el número de muestras incluidas.

Posterior a la detección de los agentes causales de las IRAs en nuestros pacientes, se procedió a determinar el perfil de citocinas en cada uno de ellos, obteniendo que para TGF- $\beta$  únicamente se detectaron 2 pacientes positivos debido a que el límite mínimo de detección de la ELISA empleada es sumamente alto (31.3 pg/ml) y ya se ha reportado en modelos animales e *in vitro* [88, 89] que los neonatos si muestran la generación de un amplio espectro de citocinas, sin embargo, debido a la inmadurez inmunológica, estas se producen en menores cantidades que en adultos [62, 90]. La producción de TGF- $\beta$  permite la replicación de hRV, ya que afecta directamente la vía de interferones al aumentar la activación de SMAD2 lo cual potencializa la producción del inhibidor SOCS1 [91]; en bocavirus, si se han encontrado citocinas profibróticas como EGF y VEGF [53], no obstante no se ha detectado TGF- $\beta$  a pesar de ser considerada la principal citocina fibrótica [92].

En cuanto al perfil de 15 citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-21, IL-23, TNF $\alpha$ , IL-10, IFN $\gamma$ , IL-4, IL-31, IL-33, IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-25, sCD40L). La infección con bocavirus genera altas concentraciones de IL-21, IL-23, IL-4 e IL-17A (Figura 4), siendo IL-4, la única reportada previamente participando en procesos Th2 así como correlacionando con el aumento de la tos en pacientes con bronquiolitis por bocavirus [55]. La IL-21 no está reportada en la infección por bocavirus, una

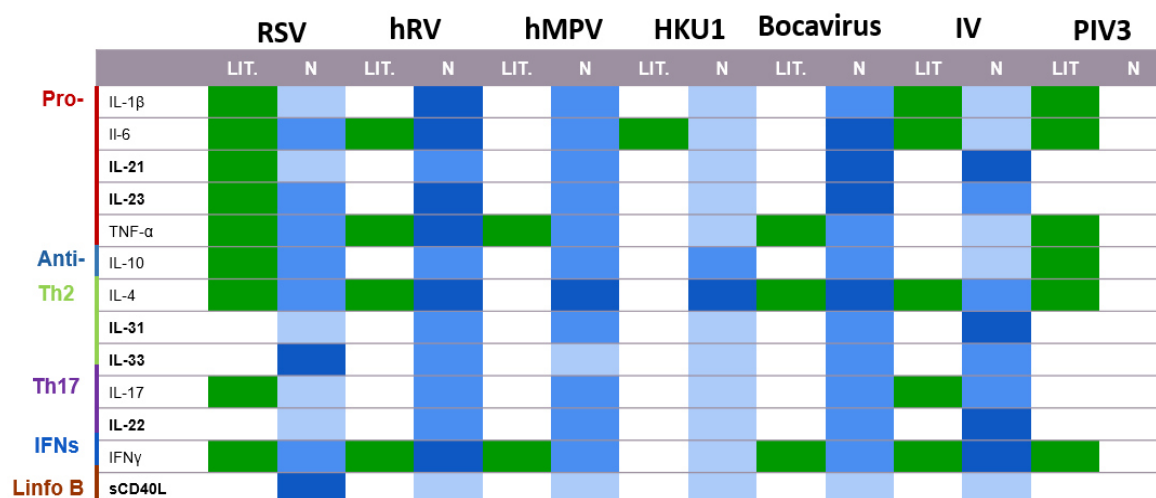
posible explicación de su participación en estas infecciones, es que al ser una citocina producida por linfocitos T y posiblemente en nuestro caso por células NKT, podría estar actuando en sinergia con IL-15 de NK y linfocitos T CD8, además de aumentar el procesamiento de antígenos por macrófagos [93]. En tanto a IL-23, esta citocina tampoco está reportada en la infección con bocavirus pero si se ha presentado en infecciones con RSV [94, 95], tomando en cuenta lo anterior, se propone lo siguiente: Al ser el bocavirus un virus de DNA de cadena sencilla puede ser detectado por TLR9 (MYD88) en los endosomas de macrófago y células dendríticas, lo cual genera la producción de IL-23, esta citocina pro-inflamatoria activa los linfocitos Th17 para producir IL-17A (citocina mucogénica) y a la par se produce IL-13 (no cuantificada en nuestro estudio), ésta activa a linfocitos Th2 para producir IL-4 (citocina mucogénica) generándose la sobreproducción de moco. Dicha sobreproducción de moco se observa en nuestros pacientes ya que 5 de 8 pacientes positivos para bocavirus presentan rinorrea.

Los pacientes infectados con hMPV presentaron altas concentraciones de TNF $\alpha$ , lo cual no se ha reportado a nivel de tracto respiratorio superior pero si en tracto respiratorio inferior en ratones BALB/c [47], siendo de vital importancia dicha citocina pro-inflamatoria para el aumento en la generación de otras citocinas (IL-6, IL-1 $\beta$ ) que permiten el control de la infección viral por la vía de señalización de NF- $\kappa$ B. En cuanto a hRV y *S. pneumoniae*, se vio que aumentan significativamente la concentración de IL-4, en ambos casos ya está reportado dicho aumento, en infecciones por hRV en pacientes asmáticos se generan altas concentraciones de IL-4 e IL-13, lo que lleva a la sobreexpresión de receptores como ICAM-1 permitiendo la infección por hRV [96], mientras en la infección por *S. pneumoniae* se genera IL-4 como un mecanismo de reparación del daño (regulando la síntesis de citocinas pro-inflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF $\alpha$ ) causado tras la infección en un modelo de ratones C57BL/6 neonatos [62].

El perfil de citocinas varía dependiente del agente causal de la IRA (Figura 5), no obstante hay una marcada tendencia a la generación de grandes concentraciones

de citocinas inflamatorias como IL-1 $\beta$  e IL-17A y de citocinas Th2 como IL-4, lo anterior nos da pauta a observar como siempre el sistema inmunológico busca un estado de homeostasis tras una infección, es decir se generan citocinas inflamatorias para eliminar el agente causal y al mismo tiempo se producen citocinas inmunoregulatoras como IL-4 para evitar la persistencia de las anteriores y con ello resolver la infección causando el menor daño posible.

A continuación (Figura 12) se muestra una comparación entre el perfil de citocinas reportado previamente en la literatura y el encontrado en nuestro estudio dependiendo del agente viral causante de la IRA.



**Figura 12. Perfil de citocinas dependiendo el virus respiratorio causal de la IRA.**

LIT.= Lo reportado en la literatura, N= Lo reportado en éste trabajo de investigación. En lo reportado en éste trabajo de investigación, el azul fuerte corresponde a la mayor concentración de citocinas y el azul claro a la menor concentración de citocinas.

En la Figura 12 cabe resaltar la detección de IL-21 e IL-23 ya que prácticamente no están reportadas para ningún virus a excepción de IL-23 con RSV, lo cual las hace atractivos blancos de futuras investigaciones con el fin de dilucidar nuevos blancos terapéuticos para estas IRA. También podemos notar como nuestro trabajo es uno de los primeros acercamientos para dilucidar el perfil de citocinas en tracto respiratorio superior de pacientes pediátricos debido a la infección por hMPV y coronavirus HKU1.

El ligando soluble sCD40L se detectó en muy bajas concentraciones en respuesta a la infección por virus respiratorios, no obstante, a pesar de ser bajas las concentraciones sCD40L se produce más en respuesta a IV y RSV. Actualmente no existen datos del papel de sCD40L tras una IRA viral, sin embargo si se posee solo un reporte de la acción de su homólogo CD40L en la superficie celular de linfocitos T CD4, células dendríticas, linfocitos B y plaquetas tras una infección con IVA; en el cual CD40L actúa como un regulador maestro del sistema inmune al interaccionar con CD40, promoviendo la expansión, supervivencia y secreción de citocinas en células presentadoras de antígeno, linfocitos B y linfocitos T [97].

Una vez determinado el perfil de citocinas, se prosiguió a comparar y correlacionar tanto los agentes etiológicos de las IRAs como los niveles de citocinas con la gravedad de nuestros pacientes. Las pacientes femeninas presentaron una mayor carga viral comparada con los masculinos (Figura 7), esto se debe principalmente a que en las mujeres prevalece una respuesta inmune celular en la niñez debida a las intermitentes liberaciones de estrógeno, el cual a bajas concentraciones potencializa la respuesta Th1 [98], dicha respuesta al ser exacerbada, en vez de resolver la infección, favorece la inmunopatología de la enfermedad. Cabe recalcar que para la resolución de la infección viral se necesita tanto la respuesta mediada por células T CD4 como por T CD8, no obstante, el incremento en la respuesta de las células T ha sido asociado con un aumento de la gravedad de la enfermedad [99].

En hMPV la carga viral correlacionó positivamente con el estatus clínico del paciente (Figura 8). Existen datos muy contradictorios en este tema, desde donde existe una correlación positiva entre carga viral y gravedad en pacientes con infección en tracto respiratorio superior [79], hasta aquellos donde no encuentran esta correlación en tracto respiratorio inferior [100]; otros lo relacionan con la progresión o curso de la enfermedad pero no con la gravedad del paciente [101]. Por todo lo anterior son necesarios más estudios para esclarecer la relación de la carga viral de hMPV con la gravedad de la enfermedad. Un común denominador en estos trabajos es la toma de muestra a pacientes diagnosticados con una



infección de tracto respiratorio inferior y que en su mayoría ya se encontraban hospitalizados al momento de la toma de la muestra. Nuestro estudio es de los primeros en reportar la asociación entre la carga viral y la gravedad del paciente a nivel de tracto respiratorio superior.

Nosotros reportamos una correlación entre la carga viral del hMPV con seno materno (Figura 8). En concordancia con nuestros resultados, se ha reportado un riesgo relativo de 2.2 veces más de ser hospitalizados aquellos pacientes infectados con RSV que no se alimentaron con leche materna [102], esta protección en edades tempranas es debido a la transferencia pasiva madre-hijo de IgA [103], IgG y citocinas [104].

El Ct de *S. pneumoniae* correlacionó con la gravedad de los pacientes (Figura 9). A menor Ct (mayor carga bacteriana), más grave estará el paciente. Como se mencionó previamente, *S. pneumoniae* es la bacteria más comúnmente detectada en pacientes con IRA [80], principalmente es bien conocida su asociación positiva con los virus de la influenza y con RSV, lo que lleva, en la mayoría de los casos, a que los pacientes tengan un mayor riesgo de ser hospitalizados [82-84].

La interacción virus y *S. pneumoniae* no afectó las cargas virales. Tampoco se pudo apreciar diferencias entre las medias del Ct de co-infección bacteriana con las mono-infecciones bacterianas (Figura 9). La única co-infección bacteriana que presentó Cts más bajos que las mono-infecciones, fue con hMPV. Existen muy pocos reportes entre la asociación de hMPV con *S. pneumoniae*, y estos son prácticamente en líneas celulares y en modelos animales [105, 106], donde se reportan que el hMPV permite la colonización bacteriana a través de la inducción de una respuesta pro-inflamatoria y la sobreexpresión de proteínas de adhesión en las células epiteliales, mecanismo reportado para RSV-*S. pneumoniae* [106]. Por lo anterior, nuestro estudio es uno de los primeros en reportar la relación hMPV-*S. pneumoniae* en tracto respiratorio superior de pacientes pediátricos.

Las citocinas pro-inflamatorias TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  se encontraron en grandes concentraciones en las infecciones graves virales (Figura 10), dichas citocinas pueden llegar a ser persistentes (tormenta de citocinas) y participar en el daño

tisular [107]. Por otro lado, IL-4 está en grandes concentraciones cuando los pacientes presentan una infección leve o moderada viral (Figura 10); como se mencionó anteriormente, IL-4 es capaz de regular la síntesis de citocinas pro-inflamatorias, activar mecanismos de reparación de los macrófagos M2 para así evitar una tormenta de citocinas y con esto una persistencia del virus [108, 109].

La mayoría de las citocinas pro-inflamatorias se observaron en altas concentraciones cuando los pacientes con IRA presentaban fiebre (Tabla 6), esto era de esperarse debido a que citocinas como IL-6 y TNF $\alpha$  son consideradas pirógenos endógenos [110]. Para las concentraciones de citocinas dependiendo del diagnóstico clínico, se pudo determinar un perfil de 6 citocinas (IL-23, IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-25 e IL-33) únicamente presentes cuando el paciente tenía neumonía (Figura 11), de las cuales la mayoría (las primeras 5) ya se encuentran reportadas [60], excepto IL-33. Esta última, es producida por fibroblastos y células epiteliales, activan a mastocitos, basófilos y eosinófilos, por lo cual se encuentra muy relacionada a procesos alérgicos, no obstante también se sabe que puede estimular la producción de IL-4 regulando la síntesis de citocinas pro-inflamatorias y es capaz de reclutar fibroblastos para la reparación del tejido dañado [111], lo cual sería de gran ayuda a nivel pulmonar. En los pacientes con diagnóstico de bronquiolitis no se encontró ninguna citocina en particular, pero compartían IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ , IL-10, IL-4 e IL-21 con los pacientes diagnosticados con neumonía [108] (Figura 11). La única citocina detectada no reportada fue IL-21, la cual no es raro encontrarla, ya que como se explicó previamente, es una citocina antiviral y la mayoría de nuestros pacientes presentan infecciones virales las cuales son capaces de generar tanto neumonía como bronquiolitis [93].

Nuestros resultados mostraron una correlación positiva entre la edad y la concentración de citocinas (Tabla 7), lo anterior pudiera ser debido a una mayor maduración del sistema inmune en los pacientes de mayor edad como previamente se ha reportado [98]. Las cargas virales decrecen cuando existe una mayor concentración de citocinas (Tabla 8), dichas citocinas estudiadas en este trabajo juegan un papel importante en la activación de la respuesta inmune innata

con el reclutamiento de células y/u otros mediadores antivirales involucrados en la inhibición de la replicación viral [17].

## Capítulo VIII: Conclusiones

- Se identificaron los agentes etiológicos virales y bacteriano causantes de IRA en pacientes pediátricos.
- Se logró determinar el perfil de citocinas local en mucosa nasal de pacientes pediátricos con IRAs.
- Bocavirus promueve la producción de IL-21 e IL-23, lo cual las hace posibles blancos terapéuticos o biomarcadores de gravedad.
- hMPV y *S. pneumoniae* correlacionan su carga viral y Ct con la gravedad de los pacientes.
- La ingesta de leche materna provee inmunidad pasiva contra hMPV.
- *S. pneumoniae* lleva a un estado clínico grave a los pacientes con IRAs.

## Capítulo IX: Bibliografía

1. Fernandes-Matano L, Monroy-Muñoz IE, Angeles-Martínez J, Sarquiz-Martinez B, Palomec-Nava ID, Pardavé-Alejandro HD, Coy-Arechavaleta AS, Santacruz-Tinoco CE, González-Ibarra J, González-Bonilla CR: **Prevalence of non-influenza respiratory viruses in acute respiratory infection cases in Mexico.** *PloS one* 2017, **12**:e0176298.
2. Rodríguez Heredia OI, Escrich L, María E, Espindola Artola A, Rodríguez Heredia OH: **Intervención educativa sobre infecciones respiratorias agudas.** *Revista Archivo Médico de Camagüey* 2010, **14**:0-0.
3. Simoes EA, Cherian T, Chow J, Shahid-Salles SA, Laxminarayan R, John TJ: **Acute respiratory infections in children.** 2006.
4. **Acute Respiratory Infection** [[https://bu.digication.com/Lewallen-IH887-Oct-2011/Acute\\_Respiratory\\_Infections](https://bu.digication.com/Lewallen-IH887-Oct-2011/Acute_Respiratory_Infections)]
5. **WHO | Causes of child mortality** [[http://www.who.int/gho/child\\_health/mortality/causes/en/](http://www.who.int/gho/child_health/mortality/causes/en/)]
6. GIACHETTO G, MARTÍNEZ M, Montano A: **Infecciones respiratorias agudas bajas de causa viral en niños menores de dos años: Posibles factores de riesgo de gravedad.** *Archivos de Pediatría del Uruguay* 2001, **72**:206-210.
7. Hart CA, Cuevas LE: **Acute respiratory infections in children.** *Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil* 2007, **7**:23-29.
8. Bhuyan GS, Hossain MA, Sarker SK, Rahat A, Islam MT, Haque TN, Begum N, Qadri SK, Muraduzzaman A, Islam NN: **Bacterial and viral pathogen spectra of acute respiratory infections in under-5 children in hospital settings in Dhaka city.** *PloS one* 2017, **12**:e0174488.
9. Austrian R: **Some aspects of the pneumococcal carrier state.** *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 1986, **18**:35.
10. Millar EV, O'Brien KL, Watt JP, Bronsdon MA, Dallas J, Whitney CG, Reid R, Santosham M: **Effect of community-wide conjugate pneumococcal vaccine use in infancy on nasopharyngeal carriage through 3 years of age: a cross-**

**sectional study in a high-risk population.** *Clinical infectious diseases* 2006, **43**:8-15.

11. Park SY, Moore MR, Bruden DL, Hyde TB, Reasonover AL, Harker-Jones M, Rudolph KM, Hurlburt DA, Parks DJ, Parkinson AJ: **Impact of conjugate vaccine on transmission of antimicrobial-resistant *Streptococcus pneumoniae* among Alaskan children.** *The Pediatric infectious disease journal* 2008, **27**:335-340.

12. Mehr S, Wood N: ***Streptococcus pneumoniae*—a review of carriage, infection, serotype replacement and vaccination.** *Paediatric respiratory reviews* 2012, **13**:258-264.

13. Manjarrez-Zavala ME, Cabello-Gutiérrez C, Rosete-Olvera DP, Gutiérrez-González LH, Ocadiz-Delgado R: *Pathogenesis of Viral Respiratory Infection*. INTECH Open Access Publisher; 2013.

14. Wang JP, Kurt-Jones EA, Finberg RW: **Innate immunity to respiratory viruses.** *Cellular microbiology* 2007, **9**:1641-1646.

15. Katze MG, He Y, Gale M: **Viruses and interferon: a fight for supremacy.** *Nature Reviews Immunology* 2002, **2**:675-687.

16. Pyzik M, Vidal SM: **NK cells stroll down the memory lane.** *Immunology and cell biology* 2009, **87**:261.

17. Kitazawa H, Villena J: **Modulation of respiratory TLR3-anti-viral response by probiotic microorganisms: lessons learned from *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505.** 2014.

18. Lanier LL: **Evolutionary struggles between NK cells and viruses.** *Nature Reviews Immunology* 2008, **8**:259-268.

19. Gordon S, Taylor PR: **Monocyte and macrophage heterogeneity.** *Nature Reviews Immunology* 2005, **5**:953-964.

20. O'Neill LA, Fitzgerald KA, Bowie AG: **The Toll-IL-1 receptor adaptor family grows to five members.** *Trends in immunology* 2003, **24**:286-289.

21. Kurt-Jones EA, Popova L, Kwinn L, Haynes LM, Jones LP, Tripp RA, Walsh EE, Freeman MW, Golenbock DT, Anderson LJ: **Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus.** *Nature immunology* 2000, **1**:398-401.

22. Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, e Sousa CR: **Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA.** *Science* 2004, **303**:1529-1531.
23. Lund J, Sato A, Akira S, Medzhitov R, Iwasaki A: **Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells.** *Journal of Experimental Medicine* 2003, **198**:513-520.
24. Hornung V, Ellegast J, Kim S, Brzózka K, Jung A, Kato H, Poeck H, Akira S, Conzelmann K-K, Schlee M: **5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I.** *Science* 2006, **314**:994-997.
25. Seth RB, Sun L, Ea C-K, Chen ZJ: **Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-κB and IRF3.** *Cell* 2005, **122**:669-682.
26. Yoneyama M, Kikuchi M, Matsumoto K, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Foy E, Loo Y-M, Gale M, Akira S: **Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity.** *The Journal of Immunology* 2005, **175**:2851-2858.
27. Rothenfusser S, Goutagny N, DiPerna G, Gong M, Monks BG, Schoenemeyer A, Yamamoto M, Akira S, Fitzgerald KA: **The RNA helicase Lgp2 inhibits TLR-independent sensing of viral replication by retinoic acid-inducible gene-I.** *The Journal of Immunology* 2005, **175**:5260-5268.
28. Nociari M, Ocheretina O, Schoggins JW, Falck-Pedersen E: **Sensing infection by adenovirus: Toll-like receptor-independent viral DNA recognition signals activation of the interferon regulatory factor 3 master regulator.** *Journal of virology* 2007, **81**:4145-4157.
29. Kimura H, Yoshizumi M, Ishii H, Oishi K, Ryo A: **Cytokine production and signaling pathways in respiratory virus infection.** *Frontiers in microbiology* 2013, **4**.
30. Schroder K, Tschopp J: **The inflammasomes.** *Cell* 2010, **140**:821-832.
31. Bustos-Arriaga J, García-Machorro J, León-Juárez M, García-Cordero J, Santos-Argumedo L, Flores-Romo L, Méndez-Cruz AR, Juárez-Delgado FJ, Cedillo-Barrón L: **Activation of the innate immune response against DENV in normal non-transformed human fibroblasts.** *PLoS neglected tropical diseases* 2011, **5**:e1420.

32. Koetzler R, Zaheer RS, Wiehler S, Holden NS, Giembycz MA, Proud D: **Nitric oxide inhibits human rhinovirus-induced transcriptional activation of CXCL10 in airway epithelial cells.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2009, **123**:201-208. e209.
33. Sharma M, Anderson SA, Schoop R, Hudson JB: **Induction of multiple pro-inflammatory cytokines by respiratory viruses and reversal by standardized Echinacea, a potent antiviral herbal extract.** *Antiviral Research* 2009, **83**:165-170.
34. Lewis TC, Henderson TA, Carpenter AR, Ramirez IA, McHenry CL, Goldsmith AM, Ren X, Mentz GB, Mukherjee B, Robins TG: **Nasal cytokine responses to natural colds in asthmatic children.** *Clinical & Experimental Allergy* 2012, **42**:1734-1744.
35. Yamaya M: **Virus infection-induced bronchial asthma exacerbation.** *Pulmonary medicine* 2012, **2012**.
36. Tabarani CM, Bonville CA, Suryadevara M, Branigan P, Wang D, Huang D, Rosenberg HF, Domachowske JB: **Novel inflammatory markers, clinical risk factors, and virus type associated with severe respiratory syncytial virus infection.** *The Pediatric infectious disease journal* 2013, **32**:e437.
37. See H, Wark P: **Innate immune response to viral infection of the lungs.** *Paediatric respiratory reviews* 2008, **9**:243-250.
38. Klouwenberg PK, Tan L, Werkman W, van Bleek GM, Coenjaerts F: **The role of Toll-like receptors in regulating the immune response against respiratory syncytial virus.** *Critical Reviews™ in Immunology* 2009, **29**.
39. Breiman A, Grandvaux N, Lin R, Ottone C, Akira S, Yoneyama M, Fujita T, Hiscott J, Meurs EF: **Inhibition of RIG-I-dependent signaling to the interferon pathway during hepatitis C virus expression and restoration of signaling by IKKε.** *Journal of virology* 2005, **79**:3969-3978.
40. Loo Y-M, Fornek J, Crochet N, Bajwa G, Perwitasari O, Martinez-Sobrido L, Akira S, Gill MA, García-Sastre A, Katze MG: **Distinct RIG-I and MDA5 signaling by RNA viruses in innate immunity.** *Journal of virology* 2008, **82**:335-345.
41. Jamaluddin M, Tian B, Boldogh I, Garofalo RP, Brasier AR: **Respiratory syncytial virus infection induces a reactive oxygen species-MSK1-phospho-Ser-276 RelA pathway required for cytokine expression.** *Journal of virology* 2009, **83**:10605-10615.



42. Ishioka T, Kimura H, Kita H, Obuchi M, Hoshino H, Noda M, Nishina A, Kozawa K, Kato M: **Effects of respiratory syncytial virus infection and major basic protein derived from eosinophils in pulmonary alveolar epithelial cells (A549).** *Cell biology international* 2011, **35**:467-474.
43. Seki E, Yoshizumi M, Tanaka R, Ryo A, Ishioka T, Tsukagoshi H, Kozawa K, Okayama Y, Okabe-Kado J, Goya T: **Cytokine profiles, signalling pathways and effects of fluticasone propionate in respiratory syncytial virus-infected human foetal lung fibroblasts.** *Cell biology international* 2013, **37**:326-339.
44. Martínez I, Lombardía L, Herranz C, García-Barreno B, Domínguez O, Melero JA: **Cultures of HEp-2 cells persistently infected by human respiratory syncytial virus differ in chemokine expression and resistance to apoptosis as compared to lytic infections of the same cell type.** *Virology* 2009, **388**:31-41.
45. Khaitov M, Laza-Stanca V, Edwards M, Walton R, Rohde G, Contoli M, Papi A, Stanciu L, Kotenko S, Johnston S: **Respiratory virus induction of alpha-, beta-and lambda-interferons in bronchial epithelial cells and peripheral blood mononuclear cells.** *Allergy* 2009, **64**:375-386.
46. Malmo J, Moe N, Krokstad S, Ryan L, Loevenich S, Johnsen IB, Espevik T, Nordbø SA, Døllner H, Anthonsen MW: **Cytokine profiles in human metapneumovirus infected children: identification of genes involved in the antiviral response and pathogenesis.** *PloS one* 2016, **11**:e0155484.
47. Guerrero-Plata A, Casola A, Garofalo RP: **Human metapneumovirus induces a profile of lung cytokines distinct from that of respiratory syncytial virus.** *Journal of virology* 2005, **79**:14992-14997.
48. Baños-Lara MDR, Harvey L, Mendoza A, Simms D, Chouljenko VN, Wakamatsu N, Kousoulas KG, Guerrero-Plata A: **Impact and regulation of lambda interferon response in human metapneumovirus infection.** *Journal of virology* 2015, **89**:730-742.
49. Hastings AK, Erickson JJ, Schuster JE, Boyd KL, Tollefson SJ, Johnson M, Gilchuk P, Joyce S, Williams JV: **Role of type I interferon signaling in human metapneumovirus pathogenesis and control of viral replication.** *Journal of virology* 2015, **89**:4405-4420.
50. Dominguez SR, Travanty EA, Qian Z, Mason RJ: **Human coronavirus HKU1 infection of primary human type II alveolar epithelial cells: cytopathic effects and innate immune response.** *PLoS One* 2013, **8**:e70129.

51. Siu K-L, Chan C-P, Kok K-H, Woo PC-Y, Jin D-Y: **Suppression of innate antiviral response by severe acute respiratory syndrome coronavirus M protein is mediated through the first transmembrane domain.** *Cellular & molecular immunology* 2014, **11**:141-149.
52. Milder E, Arnold JC: **Human metapneumovirus and human bocavirus in children.** Nature Publishing Group; 2009.
53. Khalfaoui S, Eichhorn V, Karagiannidis C, Bayh I, Brockmann M, Pieper M, Windisch W, Schildgen O, Schildgen V: **Lung infection by human bocavirus induces the release of profibrotic mediator cytokines in vivo and in vitro.** *PloS one* 2016, **11**:e0147010.
54. Guido M, Tumolo MR, Verri T, Romano A, Serio F, De Giorgi M, De Donno A, Bagordo F, Zizza A: **Human bocavirus: Current knowledge and future challenges.** *World journal of gastroenterology* 2016, **22**:8684.
55. Chung J-Y, Han TH, Kim J-S, Kim SW, Park C-G, Hwang E-S: **Th1 and Th2 cytokine levels in nasopharyngeal aspirates from children with human bocavirus bronchiolitis.** *Journal of Clinical Virology* 2008, **43**:223-225.
56. Hirose Y, Hamada H, Wakui T, Ogawa T, Terai M: **Characteristic systemic cytokine responses in children with human bocavirus-positive lower respiratory tract infection.** *Microbiology and immunology* 2014, **58**:215-218.
57. Melendi GA, Laham FR, Monsalvo AC, Casellas JM, Israele V, Polack NR, Kleeberger SR, Polack FP: **Cytokine profiles in the respiratory tract during primary infection with human metapneumovirus, respiratory syncytial virus, or influenza virus in infants.** *Pediatrics* 2007, **120**:e410-e415.
58. Iwasaki A, Pillai PS: **Innate immunity to influenza virus infection.** *Nature Reviews Immunology* 2014, **14**:315-328.
59. Yoshizumi M, Kimura H, Okayama Y, Nishina A, Noda M, Tsukagoshi H, Kozawa K, Kurabayashi M: **Relationships between cytokine profiles and signaling pathways (I $\kappa$ B kinase and p38 MAPK) in parainfluenza virus-infected lung fibroblasts.** *Frontiers in microbiology* 2010, **1**.
60. Bordon J, Aliberti S, Fernandez-Botran R, Uriarte SM, Rane MJ, Duvvuri P, Peyrani P, Morlacchi LC, Blasi F, Ramirez JA: **Understanding the roles of cytokines and neutrophil activity and neutrophil apoptosis in the protective versus deleterious inflammatory response in pneumonia.** *International Journal of Infectious Diseases* 2013, **17**:e76-e83.

61. Cheng C-W, Chien M-H, Su S-C, Yang S-F: **New markers in pneumonia.** *Clinica chimica acta* 2013, **419**:19-25.
62. Bogaert D, Weinberger D, Thompson C, Lipsitch M, Malley R: **Impaired innate and adaptive immunity to *Streptococcus pneumoniae* and its effect on colonization in an infant mouse model.** *Infection and immunity* 2009, **77**:1613-1622.
63. Sellers R, Clifford C, Treuting P, Brayton C: **Immunological variation between inbred laboratory mouse strains: points to consider in phenotyping genetically immunomodified mice.** *Veterinary pathology* 2012, **49**:32-43.
64. Lee WJ, Chung YS, Yoon HS, Kang C, Kim K: **Prevalence and molecular epidemiology of human coronavirus HKU1 in patients with acute respiratory illness.** *Journal of medical virology* 2013, **85**:309-314.
65. Watzinger F, Suda M, Preuner S, Baumgartinger R, Ebner K, Baskova L, Niesters H, Lawitschka A, Lion T: **Real-time quantitative PCR assays for detection and monitoring of pathogenic human viruses in immunosuppressed pediatric patients.** *Journal of clinical microbiology* 2004, **42**:5189-5198.
66. McAvlin JC, Reilly PA, Roudabush RM, Barnes WJ, Salmen A, Jackson GW, Beninga KK, Astorga A, McCleskey FK, Huff WB: **Sensitive and specific method for rapid identification of *Streptococcus pneumoniae* using real-time fluorescence PCR.** *Journal of clinical microbiology* 2001, **39**:3446-3451.
67. Ginocchio CC, McAdam AJ: **Current best practices for respiratory virus testing.** *Journal of clinical microbiology* 2011, **49**:S44-S48.
68. Daley P, Castriano S, Chernesky M, Smieja M: **Comparison of flocculated and rayon swabs for collection of respiratory epithelial cells from uninfected volunteers and symptomatic patients.** *Journal of clinical microbiology* 2006, **44**:2265-2267.
69. Tregoning JS, Schwarze J: **Respiratory viral infections in infants: causes, clinical symptoms, virology, and immunology.** *Clinical microbiology reviews* 2010, **23**:74-98.
70. Peltola V, Waris M, Österback R, Susi P, Hyytiä T, Ruuskanen O: **Clinical effects of rhinovirus infections.** *Journal of Clinical Virology* 2008, **43**:411-414.

71. Bonfim CM, Nogueira ML, Simas PVM, Gardinassi LGA, Durigon EL, Rahal P, Souza FP: **Frequent respiratory pathogens of respiratory tract infections in children attending daycare centers.** *Jornal de pediatria* 2011, **87**:439-444.
72. Martin ET, Kuypers J, Wald A, Englund JA: **Multiple versus single virus respiratory infections: viral load and clinical disease severity in hospitalized children.** *Influenza and other respiratory viruses* 2012, **6**:71-77.
73. Asner S, Rose W, Petrich A, Richardson S, Tran D: **Is virus coinfection a predictor of severity in children with viral respiratory infections?** *Clinical Microbiology and Infection* 2015, **21**:264. e261-264. e266.
74. Canducci F, Debiaggi M, Sampaolo M, Marinozzi MC, Berrè S, Terulla C, Gargantini G, Cambieri P, Romero E, Clementi M: **Two-year prospective study of single infections and co-infections by respiratory syncytial virus and viruses identified recently in infants with acute respiratory disease.** *Journal of medical virology* 2008, **80**:716-723.
75. Abdulhaq AA, Basode VK, Hashem AM, Alshrari AS, Badroon NA, Hassan AM, Alsubhi TL, Solan Y, Ejeeli S, Azhar EI: **Patterns of Human Respiratory Viruses and Lack of MERS-Coronavirus in Patients with Acute Upper Respiratory Tract Infections in Southwestern Province of Saudi Arabia.** *Advances in Virology* 2017, **2017**.
76. Olofsson S, Brittain-Long R, Andersson LM, Westin J, Lindh M: **PCR for detection of respiratory viruses: seasonal variations of virus infections.** *Expert review of anti-infective therapy* 2011, **9**:615-626.
77. Panda S, Mohakud NK, Pena L, Kumar S: **Human metapneumovirus: review of an important respiratory pathogen.** *International Journal of Infectious Diseases* 2014, **25**:45-52.
78. Principi N, Bosis S, Esposito S: **Human metapneumovirus in paediatric patients.** *Clinical microbiology and infection* 2006, **12**:301-308.
79. Bosis S, Esposito S, Osterhaus AD, Tremolati E, Begliatti E, Tagliabue C, Corti F, Principi N, Niesters HG: **Association between high nasopharyngeal viral load and disease severity in children with human metapneumovirus infection.** *Journal of clinical virology* 2008, **42**:286-290.
80. Bosch AA, Biesbroek G, Trzcinski K, Sanders EA, Bogaert D: **Viral and bacterial interactions in the upper respiratory tract.** *PLoS Pathog* 2013, **9**:e1003057.

81. Bellinghausen C, Rohde GG, Savelkoul PH, Wouters EF, Stassen FR: **Viral–bacterial interactions in the respiratory tract.** *Journal of General Virology* 2016, **97**:3089-3102.
82. Brealey JC, Sly PD, Young PR, Chappell KJ: **Viral bacterial co-infection of the respiratory tract during early childhood.** *FEMS microbiology letters* 2015, **362**:fnv062.
83. Cebey-López M, Herberg J, Pardo-Seco J, Gómez-Carballa A, Martínón-Torres N, Salas A, Martínón-Sánchez JM, Justicia A, Rivero-Calle I, Sumner E: **Does viral co-infection influence the severity of acute respiratory infection in children?** *PloS one* 2016, **11**:e0152481.
84. Tran D: **Respiratory viral coinfection and clinical disease severity.** *Jornal de Pediatria (Versão em Português)* 2013, **89**:421-423.
85. Damasio GA, Pereira LA, Moreira SD, Duarte dos Santos CN, Dalla-Costa LM, Raboni SM: **Does virus–bacteria coinfection increase the clinical severity of acute respiratory infection?** *Journal of medical virology* 2015, **87**:1456-1461.
86. Bogaert D, de Groot R, Hermans P: **Streptococcus pneumoniae colonisation: the key to pneumococcal disease.** *The Lancet infectious diseases* 2004, **4**:144-154.
87. Lee J: **Evaluation of a multiplex PCR Kit for the detection of respiratory viral and bacterial pathogens in patients with acute respiratory infections.** Chonbuk National University Hospital; 2012.
88. Simon AK, Hollander GA, McMichael A: **Evolution of the immune system in humans from infancy to old age.** In *Proc R Soc B*. The Royal Society; 2015: 20143085.
89. Gervassi AL, Horton H: **Is infant immunity actively suppressed or immature?** *Virology: research and TreaTmenT* 2014, **5**:1.
90. Basha S, Surendran N, Pichichero M: **Immune responses in neonates.** *Expert review of clinical immunology* 2014, **10**:1171-1184.
91. Bedke N, Sammut D, Green B, Kehagia V, Dennison P, Jenkins G, Tatler A, Howarth PH, Holgate ST, Davies DE: **Transforming growth factor-beta**

**promotes rhinovirus replication in bronchial epithelial cells by suppressing the innate immune response.** *PloS one* 2012, **7**:e44580.

92. Fernandez IE, Eickelberg O: **The impact of TGF- $\beta$  on lung fibrosis: from targeting to biomarkers.** *Proceedings of the American Thoracic Society* 2012, **9**:111-116.

93. John SY, Cox MA, Zajac AJ: **Interleukin-21: a multifunctional regulator of immunity to infections.** *Microbes and infection* 2010, **12**:1111-1119.

94. Lukacs NW, Smit JJ, Mukherjee S, Morris SB, Nunez G, Lindell DM: **Respiratory virus-induced TLR7 activation controls IL-17-associated increased mucus via IL-23 regulation.** *The Journal of Immunology* 2010, **185**:2231-2239.

95. Duvallet E, Semerano L, Assier E, Falgarone G, Boissier M-C: **Interleukin-23: a key cytokine in inflammatory diseases.** *Annals of medicine* 2011, **43**:503-511.

96. Rossi GA, Colin AA: **Infantile respiratory syncytial virus and human rhinovirus infections: respective role in inception and persistence of wheezing.** *European Respiratory Journal* 2015, **45**:774-789.

97. Hashem AM, Gravel C, Chen Z, Yi Y, Tocchi M, Jaentschke B, Fan X, Li C, Rosu-Myles M, Pereboev A: **CD40 ligand preferentially modulates immune response and enhances protection against influenza virus.** *The Journal of Immunology* 2014, **193**:722-734.

98. Muenchhoff M, Goulder PJ: **Sex differences in pediatric infectious diseases.** *Journal of Infectious Diseases* 2014, **209**:S120-S126.

99. Openshaw PJ, Tregoning JS: **Immune responses and disease enhancement during respiratory syncytial virus infection.** *Clinical microbiology reviews* 2005, **18**:541-555.

100. Yan Xi, Li Yn, Tang Yj, Xie Zp, Gao Hc, Yang Xm, Li Ym, Liu Lj, Duan Zj: **Clinical characteristics and viral load of respiratory syncytial virus and human metapneumovirus in children hospitalized for acute lower respiratory tract infection.** *Journal of medical virology* 2017, **89**:589-597.

101. Peng D, Zhao X, Liu E, Huang Y, Yang X, Zhao Y, Chen X, Zhang Z: **Analysis of viral load in children infected with human metapneumovirus.** *Iranian journal of pediatrics* 2010, **20**:393.

102. Pullan C, Toms G, Martin A, Gardner P, Webb J, Appleton D: **Breast-feeding and respiratory syncytial virus infection.** *Br Med J* 1980, **281**:1034-1036.
103. Tsutsumi H, Honjo T, Nagai K, Chiba Y, Chiba S, Tsugawa S: **Immunoglobulin A antibody response to respiratory syncytial virus structural proteins in colostrum and milk.** *Journal of clinical microbiology* 1989, **27**:1949-1951.
104. Li C, Liu Y, Jiang Y, Xu N, Lei J: **Immunomodulatory constituents of human breast milk and immunity from bronchiolitis.** *Italian journal of pediatrics* 2017, **43**:8.
105. Verkaik N, Nguyen D, De Vogel C, Moll H, Verbrugh H, Jaddoe V, Hofman A, van Wamel W, Van den Hoogen B, Buijs-Offerman R: **Streptococcus pneumoniae exposure is associated with human metapneumovirus seroconversion and increased susceptibility to in vitro HMPV infection.** *Clinical Microbiology and Infection* 2011, **17**:1840-1844.
106. Kukavica-Ibrulj I, Hamelin M-È, Prince GA, Gagnon C, Bergeron Y, Bergeron MG, Boivin G: **Infection with human metapneumovirus predisposes mice to severe pneumococcal pneumonia.** *Journal of virology* 2009, **83**:1341-1349.
107. Tisoncik JR, Korth MJ, Simmons CP, Farrar J, Martin TR, Katze MG: **Into the eye of the cytokine storm.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2012, **76**:16-32.
108. Nicholson EG, Schlegel C, Garofalo RP, Mehta R, Scheffler M, Mei M, Piedra PA: **Robust Cytokine and Chemokine Response in Nasopharyngeal Secretions: Association With Decreased Severity in Children With Physician Diagnosed Bronchiolitis.** *Journal of Infectious Diseases* 2016, **214**:649-655.
109. Luzina IG, Keegan AD, Heller NM, Rook GA, Shea-Donohue T, Atamas SP: **Regulation of inflammation by interleukin-4: a review of “alternatives”.** *Journal of leukocyte biology* 2012, **92**:753-764.
110. Dinarello CA: **Infection, fever, and exogenous and endogenous pyrogens: some concepts have changed.** *Journal of endotoxin research* 2004, **10**:201-222.
111. Liew FY, Girard J-P, Turnquist HR: **Interleukin-33 in health and disease.** *Nature Reviews Immunology* 2016, **16**:676-689.

## Capítulo X: Anexos

### 10.1 Anexo1: Encuesta diseñada por el Departamento de Pediatría

Ficha de identificación					
Fecha	Registro	Nombre	Edad	Sexo	Lugar de consulta

Antecedentes personales patológicos								
Infecciones respiratorias			Antecedentes atópicos					
1-3 al año	4-6 al año	>6 al año	Ninguno	Asma	Rinitis alérgica	Dermatitis atópica	Comorbilidades	Otra

Antecedentes personales no patológicos									
Seno materno				Asiste a guardería		Exposición a humo de cigarro			
Prematuro	Nunca	< de 6 meses	6-12 meses	Si	No	Ninguno	Diariamente	Ocasional	Motivo de la consulta

Cuadro clínico							Evolución		
Fiebre	Rinorrea	Disnea	Tos	Vomito	Hiporexia	Astenia	<24 horas	24-72 horas	>72 horas

Diagnóstico clínico				
Neumonía	Bronquiolitis	CRUP	Infecciones vías aéreas superiores	Otro

Manejo médico previo			Especificar antibioticoterapia				
Sintomático	Antibioticoterapia	amx	amc/clav	cef	tmp/smx	Otros	

Evolución		Resolución de la sintomatología			
Ambulatorio	Internamiento	24-72 horas	3-5 días	6-10 días	>10 días



## **10.2 Anexo2: Extracción de ácidos nucleicos**

1. Etiquetar el número de tubos de microcentrífuga de 1.5 ml de acuerdo a la cantidad de muestras que se procesarán. Añadir 25 µL de proteasa a cada uno de los tubos.
2. Añadir 250 µL de cada transporte viral a su respectivo tubo.
3. Añadir 200 µL de acarreador de RNA-AVL. Mezclar en vortex durante 15 segundos.
4. Incubar a 56 °C en una termoplaca durante 15 minutos. Dar un spin.
5. Añadir 250 µL de etanol absoluto grado biología molecular. Mezclar en vortex durante 15 segundos.
6. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente. Dar un spin.
7. Añadir el volumen total de la solución anterior en la columna.
8. Centrifugar a 6000 g por 1 minuto. Descartar el tubo colector y colocar la columna en uno nuevo.
9. Añadir 500 µl de solución amortiguadora AW1 en la columna. Centrifugar a 6000 g por 1 minuto. Descartar el tubo colector y colocar la columna en uno nuevo.
10. Añadir 500 µl de solución amortiguadora AW2 en la columna. Centrifugar a 6000 g por 1 minuto. Descartar el tubo colector y colocar la columna en uno nuevo.
11. Añadir 500 µl de etanol absoluto grado biología molecular en la columna. Centrifugar a 6000 g por 1 minuto. Descartar el tubo colector y colocar la columna en uno nuevo.
12. Cerrar la columna y centrifugar a 20000 g por 3 minutos. Incubar la columna por 3 minutos a 56 °C.
13. Desechar el tubo colector y colocar la columna en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml.
14. Añadir 50 µL de solución amortiguadora AVE directamente en la membrana. Cerrar la columna e incubar 1 minuto a temperatura ambiente.
15. Centrifugar a 20000 g por 1 minuto.
16. Guardar las muestras a -80 °C hasta su uso.

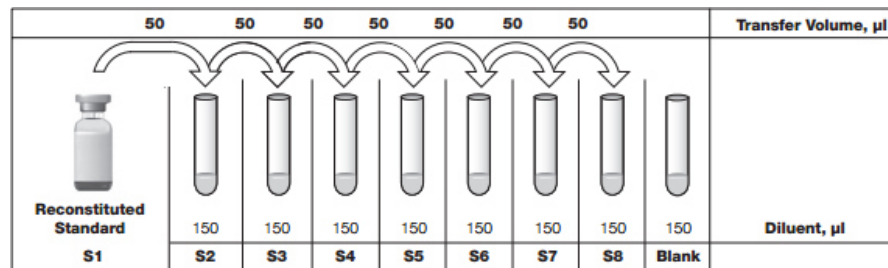
### **10.3 Anexo3: Detección de virus respiratorios por Luminex**

1. Por muestra de ácidos nucleicos, realizar la RT-PCR múltiple de la siguiente manera: Preparar el MM agregando 1.3 µl de agua libre de RNAsas, 4 µl del buffer OneStep 5x, 1.1 µl de dNTP's 10 mM, 2 µl de primers 10 mM y 1.6 µl OneStep. Dar vortex y spin.
2. Agregar 10 µl de MM a 10 µl de la muestra o de los controles internos del kit. Dar vortex y spin.
3. Poner los tubos en el termociclador y correr el siguiente programa: 50°C por 20 min, 95°C por 15 min, 35 ciclos de 95°C por 30 s, 59°C por 30 s, 72°C por 30 s y finalmente un ciclo a 72°C por 2 min.
4. Hibridar las microesferas de la siguiente manera: En tiras de PCR de 8 pocillos añadir 20 µl de microesferas en cada pozo a usarse.
5. Añadir 2 µl del producto de la RT-PCR en el pocillo correspondiente. Mezclar por pipeteo.
6. Añadir 75 µl de SAPE diluido en solución amortiguadora (1:75) a cada uno de los pocillos. Mezclar por pipeteo. Tapar la tira de pocillos con sus tapas.
7. Colocar las tirillas en el termociclador y mantenerlas a 45°C por 20 min.
8. Colocar la placa en el Bio-Plex 200 y pasar a la adquisición de datos.

## 10.4 Anexo4: Cuantificación de citocinas por Luminex

Preparación inicial:

1. Planear el diseño de la placa (posición de las muestras, estándares y controles).
2. Empezar/calentar el sistema Bio-Plex 30 min antes de comenzar. Mientras tanto, dejar los buffers y diluyentes a temperatura ambiente y comenzar a descongelar las muestras. Prender la estación de lavado y calibrar el Bio-Plex.
3. Reconstituir un vial del estándar con 781  $\mu\text{l}$  del diluyente estándar HB. Reconstituir los controles de calidad en 250  $\mu\text{l}$  del mismo diluyente. Vortex por 5 s e incubar todos los viales al mismo tiempo en hielo por 30 min.
4. Preparar las diluciones seriadas de los estándares y el blanco como se muestra a continuación. Vortex 5 s entre cada transferencia de líquido.



5. Después de descongelar las muestras, darles un vortex por 5 s.
6. Vortexear las perlas 20x por 30 s y diluir a 1x en el assay buffer. Proteger de la luz.

# de Pocillos a usarse	Perlas 20x, $\mu\text{l}$	Assay Buffer, $\mu\text{l}$	Volumen Total, $\mu\text{l}$
89	245	4651	4896

Procedimiento del ensayo:

1. Vortexear las perlas diluidas 1x. Agregar 50  $\mu\text{l}$  a cada pocillo.
2. Lavar el plato 2 veces con 100  $\mu\text{l}$  de Bio-Plex buffer de lavado.

3. Dar vortex a las muestras, estándares, blanco y controles. Añadir 50 µl a cada pocillo (Excepto de las muestras que son 100 µl).
4. Cubrir e incubar en la oscuridad por 1 hora a temperatura ambiente con agitación vigorosa ( $850 \pm 50$  RPM). Cuando falten 10 minutos para que acabe la incubación, vortexear el anticuerpo de detección por 5 s y dar un spin. Diluir a 1x como se muestra:

# de Pocillos a usarse	Anticuerpo de detección 20x, µl	Diluyente del anticuerpo de detección, µl	Volumen Total, µl
89	123	2326	2449

5. Lavar el plato 3 veces con 100 µl de buffer de lavado.
6. Dar vortex al anticuerpo de detección diluido 1x y añadir 25 µl a cada pocillo.
7. Cubrir e incubar en la oscuridad por 30 min a temperatura ambiente. Agitar a 850 RPM. Mientras tanto, preparar el protocolo en el software del Bio-Plex. Introducir los valores del estándar S1 provistos en el kit del ensayo.
8. Cuando falten 10 min para acabar la incubación, dar vortex al SAPE por 5 s y dar un spin. Diluir a 1x como se muestra y proteger de la luz.

# de Pocillos a usarse	100x SAPE, µl	Assay Buffer, µl	Volumen Total, µl
89	52	5067	5119

9. Lavar el plato 3 veces con 100 µl de buffer de lavado.
10. Vortex al SAPE diluido 1x. añadir 50 µl a cada pocillo.
11. Cubrir e incubar en la oscuridad por 10 min a temperatura ambiente. Agitar a 850 RPM.
12. Lavar el plato 3 veces con 100 µl de buffer de lavado.

13. Resuspender perlas en 125 µl de assay buffer. Cubrir y agitar a 850 RPM por 30 s.
14. Si se corrieron los controles de calidad, comparar las concentraciones observadas contra los rangos provistos en el kit. Los rangos aplican solo cuando los estándares y controles son preparados con el diluyente estándar HB.